

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
DIREKTOR PROF. DR. GERD SCHMITZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZU BILDUNG UND ABBAU
VON ANGIOTENSIN-PEPTIDEN AUS ANGIOTENSINOGEN DURCH
HUMANE PRÄADIPOCYTEN UND ADIPOCYTEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kerstin Blaul

2009

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
DIREKTOR PROF. DR. GERD SCHMITZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZU BILDUNG UND ABBAU
VON ANGIOTENSIN-PEPTIDEN AUS ANGIOTENSINOGEN DURCH
HUMANE PRÄADIPOCYTEN UND ADIPOCYTEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kerstin Blaul

2009

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gerd Schmitz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Andreas Schäffler
Tag der mündlichen Prüfung:	15. Oktober 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Fettgewebe.....	1
1.1.1	Aufbau, Entstehung, Differenzierung.....	1
1.1.2	Aufgaben und Pathophysiologie.....	1
1.2	Das Renin-Angiotensin-System	2
1.2.1	Das klassische Renin-Angiotensin-System	2
1.2.2	Lokale Renin-Angiotensin-Systeme.....	4
1.3	Komponenten des RAS: Die einzelnen Angiotensine und Rezeptoren.....	4
1.3.1	Ang-(1-9).....	5
1.3.2	Ang-(1-7).....	6
1.3.3	Des-Asp-Angiotensin I / Ang-(2-10).....	7
1.3.4	Ang III/Ang-(2-8).....	7
1.3.5	Angiotensin IV/Ang-(3-8).....	8
1.4	Das lokale Renin-Angiotensin-System des Fettgewebes.....	9
1.4.1	Komponenten und Reaktionswege des Fettgewebe-RAS	9
1.4.2	Funktion des Fettgewebe-RAS – Rolle im metabolischen Syndrom?	11
1.5	Wichtige Enzyme des RAS und ihre Inhibitoren	12
1.5.1	Aminopeptidasen	13
1.5.2	Carboxypeptidasen	15
1.5.3	Endopeptidase: Neprilysin / neutrale Endopeptidase	17
1.5.4	Enzym-Inhibitoren.....	17
1.6	Zielsetzung.....	19
2	Material.....	21
2.1	Geräte	21
2.2	Verbrauchsmaterialien	22
2.3	Chemikalien und Lösungen	23
2.3.1	Zellkultur	23
2.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	26
2.3.3	GPDH - Test	26
2.3.4	HPLC	27
2.3.5	SDS – Polyacrylamid Gelelektrophorese	28
2.3.6	Western Blotting und Immunologischer Proteinnachweis	28
3	Methoden	30
3.1	Zellkultur.....	30
3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	33
3.3	GPDH-Test	33
3.4	Abbaukinetiken und Inhibitorversuche	35

3.5	HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	37
3.6	SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese	40
3.7	Western Blotting	41
3.8	Immunologischer Proteinnachweis	42
4	Ergebnisse.....	44
4.1	HPLC-Vorversuche	44
4.1.1	Vorbereitung	44
4.1.2	Bestimmung der Retentionszeiten	45
4.1.3	Gleichzeitiger Lauf aller Angiotensin-Peptide	46
4.1.4	Ermittlung der Ausgleichsgeraden und deren Steigung	48
4.2	Abbaukinetiken.....	50
4.2.1	AGT, Ang-(1-14), Ang-(1-13)	51
4.2.2	Ang-(1-10)	51
4.2.3	Ang-(2-10)	53
4.2.4	Ang-(1-9)	55
4.2.5	Ang-(2-8)	57
4.2.6	Ang-(3-8)	58
4.2.7	Ang-(4-8)	60
4.2.8	Ang-(5-8)	62
4.2.9	Ang-(1-7)	63
4.2.10	Ang-(3-7)	65
4.2.11	Ang-(1-6)	66
4.2.12	Ang-(1-5)	67
4.2.13	Halbwertszeiten der Abbaukinetiken für PA und A.....	68
4.3	Inhibitorversuche	69
4.3.1	Ang-(1-10)	69
4.3.2	Ang-(2-10)	72
4.3.3	Ang-(1-9)	75
4.3.4	Ang-(2-8) und Ang-(3-8) mit Bestatin	77
4.3.5	Ang-(2-8) und Ang-(3-8) mit Amastatin	77
4.3.6	Halbwertszeiten der Inhibitionsversuche für PA und A.....	82
4.4	Western-Blot-Versuche	83
4.4.1	AGT-Abbau	83
4.4.2	AGT-Neusynthese	85
5	Diskussion	86
5.1	Diskussion der verwendeten Methodik.....	86
5.1.1	Nachweis von Angiotensinen mittels HPLC	86
5.1.2	Nachweis von AGT-Synthese und –Abbau mittels Western Blot.....	87
5.2	Abbau und Synthese von AGT durch humane PA und A	88
5.3	Abbau und Synthese der einzelnen Angiotensine.....	89
5.3.1	Allgemeines	89
5.3.2	Diskussion der einzelnen Abbauwege	91

6	Zusammenfassung	102
7	Literaturverzeichnis	103
8	Anhang.....	112
8.1	Abkürzungsverzeichnis	112
8.2	Abbildungsverzeichnis	114
8.3	Tabellenverzeichnis	116
9	Danksagung	117

1 Einleitung

1.1 Fettgewebe

1.1.1 Aufbau, Entstehung, Differenzierung

Das Fettgewebe ist eine spezialisierte Form des Bindegewebes und variiert in Menge, Verteilung und Art bei den verschiedenen Spezies, sowie interindividuell. Es enthält neben den „klassischen Fettzellen“, den siegelringförmigen Adipocyten und ihren fibroblasten-ähnlichen Vorläuferzellen, den Präadipocyten, noch zahlreiche andere Zellarten wie Fibroblasten, Leukozyten oder Makrophagen. Die Präadipocyten stammen von multipotenten, mesenchymalen Vorläuferzellen ab, aus denen sich auch Osteoblasten, Chondroblasten oder Myoblasten entwickeln (Ntamb et al. 2000, Gregoire et al. 1998). Die Zunahme an Fettgewebsmasse kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen: Die Entstehung neuer Adipocyten durch Proliferation und adipogene Konversion der Präadipocyten wird hyperplastisches Wachstum genannt und ist ein komplexer, noch nicht vollständig bekannter Vorgang. Während seines Verlaufes steigen Gehalt und Aktivität von Enzymen der Triacylglycerolsynthese, die Menge an Glucosetransportern und Insulinrezeptoren, sowie die Sekretion von Adipocyten-Produkten wie Leptin, Adipsin und Resistin (Gregoire 2001). Diese Art des Wachstums kommt z. B. beim Fetus vor, um das Neugeborene optimal auf die Karenzzeiten zwischen den Nahrungsaufnahmen vorzubereiten (Burdi et al. 1985; MacDougald et al. 1995). Ausdifferenzierte Adipocyten verlieren hingegen ihre Fähigkeit zur Zellteilung (Ntamb et al. 2000). Bei Bedarf können die Adipocyten jedoch durch vermehrte Lipideinlagerung deutlich an Größe zunehmen. Dieser Vorgang wird hypertrophes Wachstum genannt.

1.1.2 Aufgaben und Pathophysiologie

Es gibt zwei Arten von Fettgewebe, das weiße und das braune Fettgewebe, die sich in ihrer Morphologie, ihrem Vorkommen und ihren Aufgaben unterscheiden. Das braune Fettgewebe kommt vor allem bei Winterschläfern und Säuglingen vor und spielt eine wichtige Rolle in der Thermogenese. Dank eines speziellen mitochondrialen Transporters, dem „uncoupling protein1“, kommt es zur Entkoppelung von Protonentransport und oxidativer Phosphorylierung in den Mitochondrien der Zellen und somit zur direkten

Freisetzung der Energie als Wärme (Lowell et al. 2000). Das weiße Fettgewebe findet sich subkutan und viszeral, sowie in der Umgebung von Organen, Gefäßen und Lymphknoten. Seine Hauptaufgabe ist die Speicherung von Energie bei Nahrungsüberangebot durch Neusynthese von Triacylglycerol aus freien Fettsäuren aus dem Blut oder aus Produkten der Glykolyse (Kersten 2001). In Notzeiten werden die Lipide in Glycerol und Fettsäuren gespalten und zur weiteren Verstoffwechselung wieder in die Blutbahn abgegeben (Morrison et al. 2000). Des weiteren dient das Fettgewebe der Wärmeisolierung des Körpers und dem Schutz vor mechanischer Belastung.

Darüber hinaus ist das Fettgewebe auch ein endokrines Organ und ursächlich beteiligt an der Entwicklung Adipositas-assoziiierter Krankheitsbilder wie Diabetes mellitus oder kardiovaskuläre Erkrankungen (Gregoire 2001). Von Adipocyten frei gesetzte Hormone und Metabolite regulieren das Gefühl von Sättigkeit und Appetit (Leptin), führen zu verminderter Insulinsensitivität (Resistin, freie Fettsäuren (=FFS)), vermindern die Glucosenutzung des Skelettmuskels (Cytokine, $\text{TNF}\alpha$, FFS), steigern die Gluconeogenese in der Leber (FFS) und spielen eine wichtige Rolle in immunologischen Antworten ($\text{TNF}\alpha$, Interleukine) (Flier 1998; Steppan et al. 2001; Morrison et al. 2000).

In den letzten Jahren hat sich auch das Vorhandensein eines lokalen Renin-Angiotensin-Systems (RAS) im Fettgewebe bestätigt. Das gehäufte gemeinsame Auftreten von Adipositas und weiteren Symptomen des metabolischen Syndroms, wie Hypertonie, Hyperlipoproteinämie und gestörte Glukosetoleranz lassen eine ursächliche Beteiligung des Fettgewebe-RAS an den genannten Erscheinungen vermuten.

1.2 Das Renin-Angiotensin-System

1.2.1 Das klassische Renin-Angiotensin-System

Das klassische oder zirkulierende Renin-Angiotensin-System (RAS) ist eine proteolytische Kaskade in deren Mittelpunkt die Bildung des vasoaktiven Peptids Angiotensin II (Ang II) steht. Die Erforschung dieses Hormonsystems reicht bis ins 19. Jahrhundert zurück, als Tigerstedt und Bergman aus der Nierenrinde von Kaninchen eine blutdrucksteigernde Substanz isolierten, die sie Renin nannten (Tigerstedt et al. 1898). Seitdem wurde dieses Hormonsystem, seine Reaktionsabläufe und beteiligten Peptide intensiv erforscht.

Renin entsteht aus Prorenin durch enzymatische Abspaltung des Propeptid-Fragmentes und wird in sekretorischen Granula der juxtaglomerulären Zellen der Niere gespeichert. Seine

Freisetzung ins Blut erfolgt, wenn der renale Blutdruck um mehr als 10-15 mmHg abfällt (Knox et al. 1987). Dort spaltet es von dem in der Leber produzierten α_2 -Globulin Angiotensinogen (AGT) das biologisch inaktive Decapeptid Angiotensin I (Ang I / Ang-(1-10)) ab, das seinerseits durch Angiotensin Converting Enzym (ACE) in das biologisch aktive Octapeptid Ang II umgewandelt wird. Dieser Vorgang läuft hauptsächlich am vaskulären Endothel der Lungengefäße ab, kann jedoch ubiquitär stattfinden, da ACE in zahlreichen Organen vorkommt (Ryan et al. 1975). Die Inaktivierung von Ang II, das nur eine Halbwertszeit von wenigen Minuten hat, erfolgt durch eine Reihe unspezifischer Enzyme, die unter dem Begriff Angiotensinasen zusammen gefasst werden und das Peptid an verschiedenen Stellen attackieren (Erdös 1990).

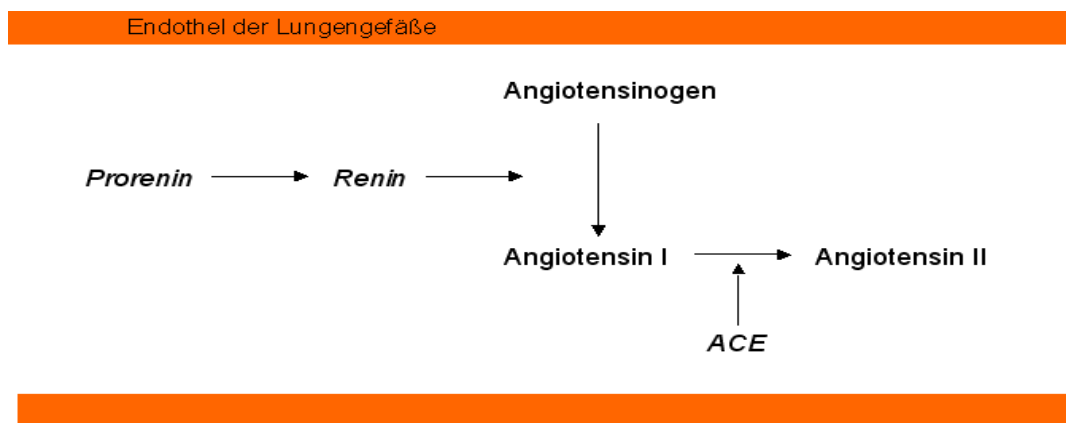


Abbildung 1: Darstellung der Reaktionsfolge des klassischen RAS

Die Hauptaufgabe des RAS ist die Beteiligung an der Regulierung von Blutdruck und Blutvolumen durch die verschiedenen Wirkmechanismen des Ang II. Zum einen kommt es zur direkten Vasokonstriktion der Arteriolen, wodurch der periphere Gefäßwiderstand und der arterielle Blutdruck ansteigen. Darüber hinaus wird die Freisetzung des Mineralokortikoids Aldosteron aus der Nebennierenrinde stimuliert, das über Natrium- und Wasserretention zu einer Zunahme des Blutdrucks und des Blutvolumens führt (Biron et al. 1968). Ang II wird jedoch auch eine wichtige Rolle in der Entstehung vaskulärer Erkrankungen, z.B. durch Stimulation der Intimaproliferation, zugesprochen (Folli et al. 1997). Hier hat sich die protektive Funktion der ACE-Hemmer bewährt. Gleichzeitig scheint jedoch durch die Hemmung des RAS die Insulin-Sensitivität erhöht zu werden (Folli et al. 1997).

1.2.2 Lokale Renin-Angiotensin-Systeme

Einen ersten Hinweis auf die Existenz lokaler RAS lieferte in den 70er Jahren die Beobachtung, dass Renin, sowie Ang I und II auch bei nephrektomierten Patienten nachgewiesen werden konnte, was auf eine extrarenale Renin-Produktion schließen ließ (Aguilera et al. 1979). In den folgenden Jahren konnten Komponenten des RAS in verschiedenen Geweben des Körpers nachgewiesen werden, darunter in Gehirn (Kobayashi et al. 1996; Sealey et al. 1977), Niere (Sealey et al. 1977; Unger et al. 1988), Nebennieren (Sealey et al. 1977; Unger et al. 1988; Samani et al. 1987), Arterien (Sealey et al. 1977; Unger et al. 1988), Herz (Dzau et al. 1987), Speicheldrüsen (Samani et al. 1987) und Hoden (Samani et al. 1987). Das Attribut „lokal“ besagt lediglich, dass die Angiotensine nicht im Gefäßsystem gebildet werden, sie können aber durchaus systemischen Einfluss nehmen. Auch können sich die Effekte der einzelnen Komponenten der lokalen RAS von denen des klassischen RAS unterscheiden. So scheint z.B. im lokalen RAS des Gehirns nicht Ang II die Hauptrolle zu spielen, sondern seine Metaboliten Ang-(2-8) und Ang-(3-8). Ang-(2-8) steigert das Durstgefühl und die Salz-Appetenz (Lindpaintner et al. 1989) und führt bei Anstieg der Plasmaosmolalität über die Freisetzung von Vasopressin (ADH = antidiuretisches Hormon; Adiuretin) aus den Nuclei supraopticus und paraventricularis zu Vasokonstriktion und einer vermehrten Rückresorption von Wasser in der Niere (Field et al. 1984). Ang-(3-8) scheint eine wichtige Rolle in Lern- und Gedächtnisprozessen, sowie in der Regulierung des zerebralen Blutflusses zu spielen (Wright et al. 1997). In den letzten Jahren zeigte sich, dass auch das Fettgewebe über ein lokales RAS verfügt, dessen Reaktionswege und biologische Funktion aber noch wenig bekannt sind.

1.3 Komponenten des RAS: Die einzelnen Angiotensine und Rezeptoren

Lange Zeit schien es, als sei das RAS ein Hormonsystem, dessen Reaktionskaskade allein auf die Bildung des einzig bekannten aktiven Metaboliten Ang II hinzielt. Ang II ist das bisher besterforschte Peptid des RAS und soll hier nur kurz erwähnt werden. Es bindet an die Angiotensin-Rezeptoren Typ 1 und 2 (AT₁- und AT₂-Rezeptor) und erhöht als potenter Vasokonstriktor den Blutdruck. Darüber hinaus beschleunigt Ang II auch unmittelbar die Herzfrequenz und führt so zu einer Steigerung des Herzzeitvolumens. In der

Nebennierenrinde führt Ang II zur Freisetzung von Aldosteron, einem Kortikosteroid, das in der Niere zu einer vermehrten Na⁺- und H₂O-Retention führt und den Na⁺-Gehalt im Urin, im Darmsekret, im Speichel und im Schweiß reduziert (Cesari et al. 2002).

Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigten jedoch, dass neben Ang II noch mindestens vier weitere Angiotensin-Peptide biologische Aktivität zeigen. Dies sind die Peptide Ang-(1-9), Ang-(1-7), Ang-(2-8)/Ang III und Ang-(3-8)/Ang IV, die im Folgenden ausführlicher dargestellt werden sollen.

AS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ang I	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	His	Leu
Ang 1-9	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	His	
Ang II	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe		
Ang 1-7	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro			
Ang III		Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe		
Ang IV			Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe		

Abbildung 2: AS-Sequenz der biologisch aktiven humanen Angiotensin-Peptide

Verschiedene Spezies zeigen teilweise einen unterschiedlichen Aufbau der Angiotensine (Morton 1993). Im Kasten unterlegt ist die jeweils identische AS-Folge des Menschen.

1.3.1 Ang-(1-9)

Ang-(1-9) wird aus Ang I durch Abspaltung der carboxyterminalen Aminosäure Leucin freigesetzt. Verschiedene Enzyme, darunter Carboxypeptidase A, eine Variante des ACE (ACE II) und Cathepsin A, auch lysosomale Carboxypeptidase genannt, können an seiner Entstehung beteiligt sein. Ang-(1-9) kann nicht durch ACE weiter zu Ang II abgebaut werden (Jackman et al. 2002).

Bereits in mikromolaren Konzentrationen konnte Ang-(1-9) ebenso wie Ang-(1-7) die vasodilatatorischen Effekte von Bradykinin an seinem B₂-Rezeptor verstärken. Dies geschieht sowohl durch Schutz des Bradykinins vor enzymatischem Abbau durch ACE-Hemmung (Snyder et al. 1986) als auch durch eine Konformationsänderung des ACE/B₂-Rezeptorkomplexes nach Interaktion mit ACE (Deddish et al. 1998). Durch vermehrte Freisetzung von NO und Arachidonsäure kann Ang-(1-9) auch die lokale Wirkung verschiedener Kinine unterstützen (Jackman et al. 2002).

1.3.2 Ang-(1-7)

Das Heptapeptid Ang-(1-7) ist neben Ang II das am intensivsten untersuchte Angiotensin-Fragment. Abhängig vom Gewebe können mindestens drei verschiedene Endopeptidasen, Neprilysin, Prolylendopeptidase und Thimetoligopeptidase, an seiner Entstehung direkt aus Ang I beteiligt sein. Alternativ kann Ang-(1-7) auch durch Abspaltung der C-terminalen Aminosäure Phenylalanin durch die Prolylcarboxypeptidase aus Ang II entstehen (Allred et al. 2000). Die Inaktivierung von Ang-(1-7) ist ebenfalls gewebeabhängig. Zirkulierendes und pulmonales Ang-(1-7), das nur eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden hat, wird durch ACE zuerst zu Ang-(1-5) und daraufhin durch verschiedene Aminopeptidasen zu kleineren Fragmenten abgebaut. In der Niere hingegen wird Ang-(1-7) durch Aminopeptidasen und Neprilysin in Ang-(1-4) und kleinere Fragmente hydrolysiert (Allred et al. 2000). Die Behandlung mit ACE-Hemmern führte bei verschiedenen Spezies durch Inhibition der Hydrolyse von Ang-(1-7) und seines Vorläuferpeptids Ang I zur Erhöhung der Ang-(1-7)-Spiegel im Blutkreislauf und zur Verlängerung seiner Halbwertszeit (Santos et al. 2000). Ang-(1-7) übt seine zentralen und lokalen Effekte sowohl über Bindung an AT₁- und AT₂-Rezeptoren als auch über ACE-Hemmung aus (Cesari et al. 2002). Freeman et al. zeigten, dass Ang-(1-7) das Zellwachstum glatter Gefäßmuskelzellen über einen eigenen Rezeptorsubtyp, der sich von den bekannten AT₁/AT₂-Rezeptoren unterscheidet, inhibiert (Freeman et al. 1996). Santos et al. identifizierten in renalem und aortalem Gewebe von Mäusen einen eigenen Ang-(1-7)-Rezeptor, den sogenannten *mas*-Rezeptor, ein Onkogen-Rezeptor (Santos et al. 2003). In einigen Organen konnten bisher zu Ang II antagonistische Effekte von Ang-(1-7) dargestellt werden. In hohen Konzentrationen verringert Ang-(1-7) die ACE-abhängige Bildung von Ang II (Deddish et al. 1998) und verbessert die vasodilatatorischen Effekte von Bradykinin am B₂-Rezeptor (Roks et al. 1999). Im zentralen Nervensystem führte die intraventrikuläre Infusion von Ang-(1-7) - im Gegensatz zur zentralnervösen Wirkung von Ang II oder Ang-(2-8) - zu einer Erniedrigung der Erregungsschwelle des Barorezeptorreflexes (Roks et al. 1999). In der Niere stimuliert Ang-(1-7) über die Freisetzung von Prostaglandin I₂ (PGI₂) und die Inhibition der tubulären Natrium- und Bicarbonatreabsorption Diurese und Natriurese (Hilchey et al. 1995). Durch direkte Wirkung am Gefäß, Potenzierung der Bradykinin-vermittelten Vasodilatation, Freisetzung der relaxatorisch wirkenden Mediatoren Bradykinin, Stickstoffmonoxid (NO = nitric oxide) und Prostaglandine (PGE₂, PGI₂), sowie durch Antagonisierung der vasokonstriktorischen Effekte von Ang II wirkt

Ang-(1-7) im Gefäßsystem vasodilatatorisch (Santos et al. 2000). Diese Effekte werden durch Gabe der in der antihypertensiven Therapie häufig eingesetzten ACE-Hemmer oder AT₁-Rezeptor-Blocker noch verstärkt. Zum einen ist dies auf die Akkumulation des Ang-(1-7)-Vorläufers Ang I und die fehlende Hydrolyse von Ang-(1-7) durch ACE zurück zu führen, zum anderen kommt es durch Rezeptorblockade zu einer Renin-vermittelten vermehrten Ang I-Bildung (Ferrario et al. 2005). Auch die antiproliferativen und antiangiogenen Effekte von Ang-(1-7) stehen der stimulatorischen Wirkung von Ang II auf Zell- und Gefäßwachstum entgegen (Freeman et al. 1996). Darüber hinaus wirkt Ang-(1-7) antiarrhythmisch und cardioprotektiv, wodurch Patienten insbesondere postischämisch von einer ACE-Hemmer-Therapie profitieren (De Mello 2004).

1.3.3 Des-Asp-Angiotensin I / Ang-(2-10)

Ang-(2-10) ist ein Nonapeptid, das aus Ang I durch Abspaltung der N-terminalen Aminosäure Aspartat entsteht. Durch ACE wird es in das biologisch aktive Ang-(2-8) abgebaut (Vaughan et al. 1977; Kono et al. 1980; Lim et al. 1998). In Studien am Menschen (Vaughan et al. 1977) und an Ratten (Kono et al. 1980) führte die intravenöse Gabe von Ang-(2-10) zu einer Steigerung des Blutdrucks und zu einer Erhöhung des Aldosteronspiegels in Plasma und Urin. Es stellte sich jedoch heraus, dass Ang-(2-10) hier als Vorläuferpeptid von Ang-(2-8) fungiert und die beobachteten Effekte erst nach seiner Hydrolyse eintreten. Da die Konversionsrate von Ang-(2-10) zu Ang-(2-8) deutlich geringer ist als die von Ang I zu Ang II, wurde dem Peptid jedoch nur geringe physiologische Relevanz im RAS beigemessen (Vaughan et al. 1977). Im Gegensatz dazu konnten jedoch Lim et al. am Aortenmodell von normotensiven und spontan hypertensiven Ratten zeigen, dass Ang-(2-10) auch in Anwesenheit des ACE-Hemmers Captopril konzentrationsabhängig direkt die Kontraktilität steigerte (Lim et al. 1998). Dieser Effekt konnte durch den AT₁-Rezeptor-Antagonisten Losartan, nicht jedoch durch einen AT₂-Rezeptorantagonisten inhibiert werden. Dies legt nahe, dass Ang-(2-10) seine biologische Wirkung AT₁-Rezeptor-vermittelt ausübt. Über die genaue physiologische Bedeutung von Ang-(2-10) ist jedoch noch wenig bekannt.

1.3.4 Ang III/Ang-(2-8)

Das Heptapeptid Ang-(2-8), auch Ang III genannt, entsteht aus Ang II nach Abspaltung der N-terminalen Aminosäure Aspartat durch die Aminopeptidase A und wird durch die

Aminopeptidase N zu Ang-(3-8) abgebaut (Zini et al. 1996). Die Bindungsaffinität von Ang-(2-8) zu AT₁- und AT₂-Rezeptoren entspricht der von Ang II, allerdings ist Ang-(2-8) anfälliger für enzymatische Hydrolyse durch die Aminopeptidase N und deshalb weniger wirkungsvoll (Cesari et al. 2002). Ang-(2-8) übt seine biologische Wirkung jedoch hauptsächlich im zentralen Nervensystem (ZNS) aus. Die Infusion von Ang II und Ang-(2-8) in das zerebrale Ventrikelsystem von Mäusen führte zu einer Erhöhung des Blutdrucks, zu einer vermehrten Freisetzung von Vasopressin und zur Steigerung des Durstgefühls und damit zu einer vermehrten Wasseraufnahme (Wright et al. 1994). Studien mit Inhibitoren der Aminopeptidase A bzw. N zeigten, dass nur Ang-(2-8) für diese zentralnervösen Wirkungen verantwortlich ist und Ang II lediglich als Ang-(2-8)-Vorläufer fungiert (Zini et al. 1996). Inhibitoren der Aminopeptidase A, die die Blut-Hirn-Schranke passieren können, könnten deshalb therapeutische Bedeutung in der Bekämpfung der Hypertonie erlangen. Im kardiovaskulären System bindet Ang-(2-8) an AT₁-Rezeptoren und führt zu Vasokonstriktion, Aldosteronfreisetzung und Natriumretention. Auch ist Ang-(2-8) neben Ang II das einzige bisher bekannte Angiotensin-Peptid, das Katecholamine aus dem Nebennierenmark freisetzt, allerdings mit einer geringeren Sekretionsrate als Ang II (Ackerley et al. 1976). Systemische und zentrale Effekte von Ang-(2-8) unterstützen damit die Wirkung von Ang II auf die cardiovaskuläre Homöostase.

1.3.5 Angiotensin IV/Ang-(3-8)

Das Hexapeptid Ang-(3-8), auch Ang IV genannt, ist das vorrangige Abbauprodukt des Ang-(2-8)-Metabolismus und entsteht durch Abspaltung der N-terminalen Aminosäure Arginin durch die Aminopeptidase N. Es kann jedoch auch direkt aus Ang II gebildet werden. Ang-(3-8) hat nur eine kurze Halbwertszeit, da es durch verschiedene Amino-, Endo- und Carboxypeptidasen schnell in inaktive Fragmente abgebaut wird (Cesari et al. 2002). Es kann, wenn auch mit niedrigerer Affinität als Ang II oder Ang-(2-8), an AT₁-Rezeptoren binden und AT₁-vermittelte Effekte auslösen. Seine vorrangige Wirkung übt Ang-(3-8) nach bisherigen Erkenntnissen im zentralen Nervensystem aus. Infusion von Ang-(3-8) in das Gehirn von Ratten führt zu einer Verbesserung von Gedächtnis- und Lernprozessen und zur Revision einer Amnesie (Wright et al. 1999). Darüber hinaus erniedrigt Ang-(3-8) den renalen und cerebralen Gefäßwiderstand, führt bei Hühnern und Ratten zu einer Hypertrophie, Hyperplasie und

Zellproliferation der Herzmuskelzellen und setzt aus Endothelzellen den Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ-1 (PAI-1) frei (Cesari et al. 2002).

Im ZNS wurde erstmals ein dort sehr zahlreich vorkommender spezifischer Ang-(3-8)-Rezeptor identifiziert, der daraufhin bei verschiedenen Spezies auch in anderen Organen, wie Niere, Nebenniere, Herz, Endothelium und Fettgewebe gefunden wurde (Wright et al. 1995). Trotz seines zahlreichen Vorkommens waren die Identität dieses AT₄-Rezeptors, sowie seine Wirkmechanismen lange Zeit unbekannt. Albiston et al. zeigten 2001, dass der AT₄-Rezeptor identisch ist mit der Insulin-regulierten Aminopeptidase (IRAP), einer unspezifischen Zink-Metallopeptidase, zu deren Substraten in vitro Oxytocin, Vasopressin, Bradykinin und Ang III zählen (Albiston et al. 2001; Herbst et al. 1997). Ang-(3-8) bindet mit hoher Affinität an dieses Enzym, wird jedoch nur langsam umgesetzt und erfüllt somit, unter anderem auch im Fettgewebe, die Rolle eines klassischen Inhibitors (Herbst et al. 1997). Im ZNS wurden durch Inhibition der IRAP endogene Neuropeptide mit gedächtnissteigernder Wirkung, wie Vasopressin, Substanz P oder Somatostatin, vermindert abgebaut, was ursächlich sein könnte für die zentralnervösen Effekte von Ang-(3-8) (Albiston et al. 2001). In den insulinsensitiven Geweben, den Adipocyten und Skelettmuskelzellen, finden sich IRAP und GLUT₄, der insulinsteuerte Glucose Transporter Typ 4, in denselben intracellulären Vesikeln (Ross et al. 1996). Nach Insulinstimulation kommt es zur Translokation der Vesikel an die Plasmamembran und Freisetzung der enthaltenen Peptide an die Zelloberfläche (Keller 2003). Durch die erhöhte Anzahl an GLUT₄-Transportern kommt es dann zur insulinabhängigen Glucoseaufnahme in die Zellen. Studien an IRAP-Knockout-Mäusen (Keller et al. 2002) und 3T3-L1-Adipocyten (Yeh et al. 2007) zeigten, dass IRAP essentiell für die Translokation der Vesikel an die Zelloberfläche ist. Welche Rolle die IRAP nach Erscheinen an der Zelloberfläche spielt und was deren Inhibition durch Ang-(2-8) bewirkt, ist noch weitgehend unerforscht. So könnte durch die IRAP-Inhibition die GLUT₄-Wirkung und die Glucoseaufnahme beeinflusst werden.

1.4 Das lokale Renin-Angiotensin-System des Fettgewebes

1.4.1 Komponenten und Reaktionswege des Fettgewebe-RAS

Der erste Hinweis auf ein lokales RAS im Fettgewebe stammt aus dem Jahr 1987, als sich herausstellte, dass in der Aorta gefundene AGT-mRNA fast ausschließlich im umgebenden

Fettgewebe exprimiert wird (Campbell et al. 1987). Seither wurden Komponenten des RAS im Fettgewebe sämtlicher untersuchter Spezies nachgewiesen. Auch menschliche Präadipocyten und Adipocyten exprimieren Angiotensinogen, Renin, ACE und AT-Rezeptoren und verfügen somit über ein funktionelles RAS (Schling et al. 1999). Die Expression von AGT-m-RNA steigt während der Differenzierung humaner und muriner Präadipocyten zu Adipocyten an (Schling et al. 2001; Saye et al. 1989; Saye et al. 1990). Desweiteren ist die AGT-mRNA-Expression noch von zahlreichen weiteren Faktoren und Hormonen beeinflusst, von Alter und Geschlecht des Individuums, vom Aktivitätszustand des vegetativen Nervensystems, von Fettsäuren, Glucokortikoiden, TNF α , Insulin und Geschlechtshormonen (Engeli et al. 2000). Viele dieser Faktoren wurden jedoch nur am Nagetier-Modell untersucht und es ist fraglich, ob alle Effekte auf den Menschen übertragbar sind. Studien über einen Zusammenhang des Ausmaßes der Adipositas und der AGT-Genexpression im humanen Fettgewebe ergaben sowohl positive (van Harmelen et al. 2000) als auch negative Korrelationen (Jones et al. 1997). Insgesamt lassen die sehr inhomogenen Ergebnisse und die starken Schwankungen bei verschiedenen Testpersonen vermuten, dass oben genannte Einflussgrößen eine größere Rolle spielen, als die Masse an Fettgewebe selbst. Jedoch scheint eine unveränderte oder sogar leicht verringerte Genexpression der RAS-Komponenten in den Adipocyten bei adipösen Probanden mit dementsprechend deutlich erhöhter Fettgewebssmasse eine insgesamt gesteigerte systemische Aktivität des RAS zu bewirken (Engeli et al. 2005).

Über die Synthese- und Abbauwege der einzelnen Komponenten des Fettgewebe-RAS, sowie die beteiligten Proteasen ist bisher nur wenig bekannt. Es wurden bereits zahlreiche Aminopeptidasen, Carboxypeptidasen und Endopeptidasen, unter anderem Renin, ACE, Kallikrein, Cathepsin D und Cathepsin G, die alle eine Rolle in der Spaltung verschiedener Angiotensinpeptide spielen, gefunden (Karlsson et al. 1998). Das humane Fettgewebe ist sowohl in der Lage, Ang II neu zu bilden, als auch wieder abzubauen (Schling et al. 2002). Allerdings wurde Ang II nur in sehr geringen Mengen im Fettgewebe (Phillips et al. 1993) und in Zellkulturüberständen humaner Fettgewebszellen gefunden (Schling et al. 2002). In einer Studie mit kultivierten humanen Präadipocyten und Adipocyten konnte gezeigt werden, dass Ang II durch die Endopeptidase Neprilysin, deren Expression im Verlauf der adipogenen Konversion zunimmt, zu den beiden Peptidfragmenten Ang-(1-4) und Ang-(5-8) abgebaut wird (Schling et al. 2002). So wird durch die rasche enzymatische Inaktivierung von Ang II sowohl seine Akkumulation, als auch die Umwandlung in weitere aktive Angiotensin-Fragmente, wie sie in der Zirkulation, der Niere und dem ZNS

entstehen, verhindert. Einige Effekte des humanen Fettgewebe-RAS werden vermutlich ebenfalls über AT_1 - und AT_2 -Rezeptoren ausgeübt, wobei AT_1 -Rezeptoren in etwa gleichbleibend, AT_2 -Rezeptoren während der adipogenen Konversion in zunehmender Zahl exprimiert werden (Schling 2002).

1.4.2 Funktion des Fettgewebe-RAS – Rolle im metabolischen Syndrom?

Es ist noch wenig bekannt über eine mögliche systemische Wirkung des Fettgewebe-RAS oder seine Beteiligung an der Regulierung des Blutdrucks und des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Insbesondere interessiert hier eine mögliche Beteiligung des Fettgewebe-RAS an der Entstehung des metabolischen Syndroms. Das metabolische Syndrom, auch Wohlstandssyndrom genannt, bezeichnet das gehäufte gemeinsame Auftreten von stammbetonter Adipositas, essentieller Hypertonie, Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus, sowie Hypertriglyceridämie mit erhöhten LDL- und erniedrigten HDL-Cholesterinspiegeln. Dieses Erscheinungsbild ist in der industrialisierten Welt sehr häufig anzutreffen und ist der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung von Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen, wie Artherosklerose und Myokardinfarkt. Beide Krankheitsbilder stellen in der westlichen Welt immer noch die häufigsten Todesursachen dar. Die pathophysiologischen Mechanismen und kausalen Zusammenhänge der einzelnen Komponenten des metabolischen Syndroms sind noch weitgehend unbekannt. Die Adipositas, d.h. die übermäßige Vermehrung des Fettgewebes, ist hierbei ein zentraler Faktor und ursächlich an der Entstehung von Dyslipidämie und Insulinresistenz beteiligt. Da Ang II eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulierung spielt und in den Insulin-Signaltransduktionsweg eingreifen kann, könnte dem lokalen RAS des Fettgewebes eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des metabolischen Syndroms zukommen.

Verschiedene Studien haben bisher einen möglichen Zusammenhang zwischen dem RAS und einzelnen Komponenten des metabolischen Syndroms untersucht. Allerdings unterscheiden sich hier die am Nagetier-Modell und an humanen Adipocyten gewonnenen Erkenntnisse teilweise deutlich. So induzierte Ang II im Mäusemodell durch Stimulierung der Freisetzung von Prostaglandinen aus Adipocyten die adipogene Konversion von Präadipocyten (Darimont et al. 1994), während die Differenzierung humaner Präadipocyten durch Ang II und AGT inhibiert und die Hypertrophie bereits vorhandener Adipocyten stimuliert wurde (Schling et al. 2001, Janke et al. 2002). In einer 2005 veröffentlichten Studie am Menschen konnte gezeigt werden, dass übergewichtige

Personen im Vergleich zu normalgewichtigen Individuen höhere Serumkonzentrationen an AGT, Renin, Aldosteron und ACE aufwiesen, die nach 5% Gewichtsreduktion jeweils deutlich abnahmen. Darüber hinaus lag bei den übergewichtigen Testpersonen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere AGT-Genexpression im subcutanen Fettgewebe vor, die nach Gewichtsreduktion und Verringerung des Bauchumfanges weiter abnahm (Engeli et al. 2005). Ebenso nahmen die systolischen Blutdruckwerte und die Insulinkonzentration im Plasma nach Gewichtsreduktion ab. Das Fettgewebe scheint auch an der Regulierung des Serum-Cholesteringehaltes mitzuwirken. Die aus dem Nahrungsfett oder aus endogen in der Leber gebildetem Fett entstehenden freien Fettsäuren werden abhängig vom Energiebedarf des Organismus ins Fettgewebe transportiert. In den Adipocysten werden in den Lipidtröpfchen und der Plasmamembran große Mengen an Cholesterin gespeichert. Hypertrophierte Adipocysten weisen einen verminderten Cholesteringehalt der Plasmamembran, sowie eine zunehmende Insulinresistenz auf, bei gleichzeitig vermehrter Sekretion von AGT und anderen Sekretionsprodukten wie TNF α , Fettsäuren und Interleukinen (LeLay et al. 2001). Die daraus resultierende Hyperinsulinämie wiederum führt zu vermehrter Expression und Sekretion von AGT und Ang II (Harte et al. 2003) und damit zu einer Induktion des RAS mit resultierender Blutdruckerhöhung.

Alle diese Studien zeigen, dass die einzelnen Faktoren des metabolischen Syndroms in engem Zusammenhang zueinander stehen und dass Komponenten des lokalen Fettgewebe-RAS möglicherweise an der Entstehung von Hypertonie, Insulinresistenz und Dyslipoproteinämie ursächlich beteiligt sind. Diese Erkenntnisse könnten entscheidende Bedeutung in der Therapie und Prophylaxe des metabolischen Syndroms erlangen. In der Hypertonie-Behandlung werden ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptoren-Blocker bereits erfolgreich eingesetzt. Weitere Studien sind jedoch vonnöten, um die Reaktionswege des lokalen RAS, die entstehenden Ang-Peptide und beteiligten Enzyme zu identifizieren und seine pathophysiologische Rolle in der Entstehung des metabolischen Syndroms zu beweisen.

1.5 Wichtige Enzyme des RAS und ihre Inhibitoren

Die am Angiotensin-Abbau beteiligten Enzyme können in drei Gruppen unterteilt werden: Aminopeptidasen, die Peptide am aminoterminalen Ende angreifen, Carboxypeptidasen, die carboxyterminale Aminosäuren abspalten und Endopeptidasen, die zentral gelegene

Peptidbindungen spalten. Abbildung 2 verdeutlicht, dass alle aktiven Ang-Peptide eine gemeinsame Grundsequenz besitzen, nämlich die AS-Folge Val–Tyr–Ile–His–Pro, die für die Bindung an die AT₁- und AT₂-Rezeptoren verantwortlich zu sein scheint. Die Abspaltung einer aminoterminalen oder carboxyterminalen Aminosäure eines längeren Ang-Peptids führt deshalb oft zur Entstehung eines weiteren aktiven Metaboliten, der an denselben Rezeptor binden kann. Aus diesem Grund werden diese Enzyme auch „transformierende Enzyme“ genannt (Goodfriend 1993). Zur schnellen Inaktivierung der biologisch aktiven RAS-Peptide muss hingegen durch eine Endopeptidase die zentrale gemeinsame AS-Sequenz gespalten werden, wodurch die Aktivität des Peptids verloren geht. Im Folgenden werden einige derjenigen Enzyme näher beschrieben, die eine Rolle im RAS-System spielen und bereits im Fettgewebe nachgewiesen wurden. Aus der großen Anzahl an Enzym-Inhibitoren werden nur diejenigen erwähnt, die in den Versuchen verwendet wurden.

1.5.1 Aminopeptidasen

Aminopeptidase A/Glutamyl-AP (EC 3.4.11.7)

Die Aminopeptidase A (APA) oder Glutamylpeptidase ist eine zinkhaltige Metallopeptidase, die vor allem an Peptide mit den Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure an N-terminaler Stelle bindet. Sie wurde bisher in zahlreichen Organen und Geweben nachgewiesen, darunter im Endothel, Gehirn, Niere, Nebenniere, Leber, Erythrozyten und Muskelzellen (Goodfriend 1993). Es liegen jedoch noch keine Hinweise auf ein Auftreten im Fettgewebe vor. APA führt zur Entstehung des aktiven Metaboliten Ang-(2-8) aus Ang II durch Abspaltung der N-terminalen Aminosäure Asparaginsäure. Studien an Nagetieren zeigen, dass die Aminopeptidase dadurch eine wichtige Funktion in der Regulierung des Blutdrucks einnimmt (Mitsui et al. 2003). Ihr Serumspiegel steigt bei erhöhtem Ang II-Gehalt an, ebenso im Blut schwangerer Frauen, um die vermehrte fetale Produktion der vasoaktiven Substanzen Ang II und AVP zu neutralisieren (Pipkin et al. 1977). 1996 wurde zum ersten Mal gezeigt, dass APA auch im lokalen RAS des Gehirns zur Entstehung des aktiven Metaboliten Ang-(2-8) führt (Zini et al. 1996). Auch im lokalen RAS von glatten Gefäßmuskelzellen (Mentlein et al. 1996) und der Niere (Poumarat et al. 2002) ist APA für die Entstehung von Ang-(2-8) aus Ang II verantwortlich. APA, zu deren weiteren Substraten auch Oxytocin gehört, wird durch

Chelatbildner wie EDTA, sowie durch den unspezifischen Amino-peptidase-Inhibitor Amastatin inhibiert (Goodfriend 1993).

Amino-peptidase B/Arginin-AP (EC 3.4.11.6)

Eine weitere am Angiotensin-Stoffwechsel beteiligte Amino-peptidase ist die Arginyl-peptidase oder Amino-peptidase B (APB), ebenfalls eine membrangebundene Zink-Metalloprotease. Sie spaltet selektiv Arginin und Lysin-Reste vom N-terminalen Ende bevorzugt kurzer Peptide ab. Zu ihren Substraten zählen unter anderem Ang-(2-8), Bradykinin, ANF, Enkephaline und Somatostatin (Foulon et al. 1999). Ihre Aktivität kann durch Bestatin, nicht jedoch Amastatin inhibiert werden (Müller et al. 1982; Nagata et al. 1991). APB wurde bisher in zahlreichen Geweben gefunden, darunter in Gehirn, Herz, Niere, Eingeweide, Leber, Lunge und Muskelzellen (Foulon et al. 1999). Über ein Vorhandensein dieser Amino-peptidase im Fettgewebe ist wenig bekannt.

Amino-peptidase N/Alanin-AP (EC 3.4.11.2)

Die Amino-peptidase N (APN), auch bekannt unter dem Namen Amino-peptidase M oder Alanin-Amino-peptidase, ist mit dem Oberflächenantigen CD 13 identisch (Look et al. 1989). Sie ist eine transmembrane Zink-Metalloprotease, die in zahlreichen Geweben und Zellen, darunter auch im Fettgewebe, membrangebunden und in löslicher Form verbreitet ist (Bauvois et al. 2006). Bevorzugt spaltet sie neutrale oder basische N-terminale Aminosäuren von Oligopeptiden ab. Sie inaktiviert das biologisch aktive Ang-(2-8) durch sukzessive Abspaltung N-terminaler Aminosäuren unter Entstehung der Spaltprodukte Ang-(3-8) und Ang-(5-8) (Engeli et al. 2002). Darüber hinaus spielt APA eine wichtige Rolle in pathophysiologischen Prozessen. So dient sie als Membranrezeptor für Coronaviren und trägt somit zur Entstehung von Infekten des Respirationstraktes bei (Yeager et al. 1992). Auch ist sie bei chronisch entzündlichen Erkrankungen und verschiedenen Tumorleiden verstärkt exprimiert und nimmt Einfluss auf Immungeschehen, Zellwachstum, -differenzierung und Angiogenese (zusammengefasst in Bauvois et al. 2006). APN wird sowohl durch Amastatin wie auch durch Bestatin inhibiert (Wilkes et al. 1985; Müller et al. 1982).

Leucin-AP/Ang IV-Rezeptor (EC 3.4.11.3)

Die Leucin-Amino-peptidase (LAP) oder Cystinyl-Amino-peptidase ist ein weiteres Mitglied der Zink-Metalloprotease-Familie. Sie kann als einzige bekannte

membranständige Amino-peptidase die N-terminale Cystin-Ringstruktur kleiner Peptide wie Oxytocin und Vasopressin öffnen (Herbst et al. 1997). Darüber hinaus werden auch Ang II, Ang-(2-8), sowie Neuropeptide wie Substanz P und Somatostatin durch LAP inaktiviert (Herbst et al. 1997). LAP wurde bereits in Adipocyten nachgewiesen und wird sowohl durch Bestatin, als auch durch Amastatin inhibiert (Hattori et al. 1999; Wilkes et al. 1985; Müller et al. 1982). Molekulargenetische Untersuchungen haben ergeben, dass die LAP mit der Insulin-regulierten Membran-Amino-peptidase (IRAP) identisch ist (Keller et al. 1995). Die IRAP liegt in Adipocyten und Skelettmuskelzellen zusammen mit dem Glucose-Transporter GLUT₄ in gemeinsamen Vesikeln vor und dient als Rezeptor für Ang-(3-8), einem Inhibitor der IRAP (Albiston et al. 2001). Ausführlicher wird dieses Enzym in 1.3.5 beschrieben.

1.5.2 Carboxypeptidasen

Angiotensin-Converting Enzym (ACE)

Angiotensin-Converting Enzym (ACE) wurde 1954 von Skeggs et al. entdeckt und führt zur Entstehung von Ang II aus Ang I durch Abspaltung des C-terminalen Dipeptids (Skeggs et al. 1954). Es ist nicht sehr substratspezifisch und bevorzugt kurze Peptide, von denen es meist ein C-terminales Dipeptid abspaltet, z.B. Ang-(1-9), Ang-(1-7), Ang-(3-8), Enkephaline, Endorphine oder Insulin (Skidgel et al. 1987; Igic et al. 1973). Es wird jedoch durch die AS Prolin an C-terminaler Stelle potentieller Substrate inhibiert, weswegen Ang II nicht gespalten werden kann. ACE wurde bisher sowohl frei löslich, als auch membrangebunden in verschiedenen Geweben, darunter im Blut, Urin, Liquor, Lunge, Gehirn, Herz, Niere, Nebennieren und auch im Fettgewebe nachgewiesen (Erdös 1975; Schling et al. 1999). Darüber hinaus konnte bisher an Endothelzellen und Adipocyten gezeigt werden, dass membrangebundenes ACE auch die Funktion eines Rezeptors ausübt (Böttcher et al. 2006). Möglicher Ligand könnte Ang-(1-7) sein, das an ACE bindet, jedoch nur langsam umgesetzt wird. Weitere Funktionen von ACE sind unter anderem die Freisetzung von Dipeptiden aus längeren Peptiden zur Absorption im Intestinaltrakt und der Schutz des Fetus vor mütterlichen Peptiden durch deren Inaktivierung in der Plazenta (Skidgel et al. 1993).

Angiotensin-Converting Enzym 2 (ACE 2)

Die Metalloprotease ACE 2 ist das erste Homolog zu ACE, das beim Menschen beschrieben wurde (Turner et al. 2002). Die beiden Enzyme weisen eine 42%ige Identität der AS-Sequenz auf (Ferrario et al. 2005). Erhöhte ACE 2-mRNA-Expression wurde insbesondere für Herz, Niere sowie Gastrointestinaltrakt beschrieben (Harmer et al. 2002). Im Gegensatz zu ACE, das zwei AS von Ang I abspaltet, hydrolysiert ACE 2 jeweils eine AS vom C-terminalen Ende seiner Substrate, bevorzugt zwischen Prolin und einer hydrophoben/basischen AS (Ferrario et al. 2005). Unter anderem hydrolysiert es Ang I zu Ang-(1-9) und Ang II zu Ang-(1-7), letzteres allerdings mit 500fach höherer katalytischer Effizienz (Vickers et al. 2002). Weitere Substrate von ACE 2 sind Bradykinin, Neurotensin, Kinetensin, Apelin 13 und Dynorphin A (Burrell et al. 2004). Ein weiterer Unterschied der beiden Enzyme ist die weitgehende Resistenz von ACE 2 gegen die gängigen ACE-Inhibitoren (Turner et al. 2002; Ferrario et al. 2005).

Carboxypeptidasen C und P

Eine Carboxypeptidase, die am Angiotensin-Abbau beteiligt ist und auch im Fettgewebe nachgewiesen wurde, ist die Carboxypeptidase C (CP-C) (EC 3.4.16.5), auch Prolyl-Carboxypeptidase oder Cathepsin A genannt. Sie ist eine Serinprotease, die hauptsächlich intralysosomal vorkommt und nach Freisetzung in löslicher oder membrangebundener Form auch extrazelluläre Aktivität hat (Skidgel et al. 1998). Das weit verbreitete Enzym bildet die aktiven Peptide Ang-(1-7) aus Ang II und Ang-(1-9) aus Ang I und kann durch Organophosphate und Prolinanaloga inhibiert werden (Goodfriend 1993). In glatten Muskelzellen setzt die Carboxypeptidase P (EC 3.4.17.16) Ang-(1-7) aus Ang II frei (Mentlein et al. 1996).

Carboxypeptidase A6 (CPA6)

CPA6 gehört zur Familie der Metalloproteasen und wird hauptsächlich im ZNS, insbesondere im olfaktorischen System, exprimiert (Lyons et al. 2008). In diesem Zusammenhang wird eine Verbindung zum Duane-Syndrom, einer Fehlfunktion des 6. Hirnnerven mit resultierenden Augenmuskelerkrankungen, postuliert. CPA6 bevorzugt Substrate mit langen hydrophoben C-terminalen AS sowie Histidin, wogegen Peptide mit Glycin oder Prolin an vorletzter Position oder den basischen AS Lysin und Arginin an terminaler Stelle nicht hydrolysiert werden. Zu seinen Substraten zählen Ang I, Ang-(2-10), Enkephaline und Neurotensin. Während Enkephaline und Neurotensin durch

Hydrolyse inaktiviert werden, entstehen aus Ang I und Ang-(2-10) durch zweimaliges Abspalten der C-terminalen AS Leucin und Histidin die vasoaktiven Ang II bzw Ang (2-8). Allerdings konnten im ZNS nur geringe Mengen des Zwischenproduktes Ang-(1-9) gefunden werden, so dass der zweite Schritt vermutlich schneller abläuft (Lyons et al. 2008). CPA6 wird durch PCI inhibiert.

1.5.3 Endopeptidase: Neprilysin / neutrale Endopeptidase

Neprilysin, das auch unter den Namen neutrale Endopeptidase, Enkephalinase, CALLA oder CD 10 bekannt ist, ist ein ubiquitär verbreitetes, unspezifisches Enzym, das zur Gruppe der membranständigen Zink-Metalloproteasen gehört (Roques et al. 1993). Zu seinen Substraten zählen eine Gruppe von Peptiden mit neuronaler Aktivität (Enkephaline, Neurotensine, Substanz P), sowie Peptide mit vasoaktiver Funktion (Endothelin, Kinine, ANF) (Roques et al. 1993). In vitro, wie auch in vivo konnte gezeigt werden, dass auch Ang II von Neprilysin hydrolysiert wird (Erdös et al. 1989; Allred et al. 2000). Vor kurzem konnte Neprilysin auch im Fettgewebe als das entscheidende Enzym des Ang II-Abbaus identifiziert werden (Schling et al. 2002). Es spaltet das Peptid zentral und führt zur Entstehung der beiden inaktiven Peptidfragmente Ang-(1-4) und Ang-(5-8) und verhindert somit das Auftreten weiterer aktiver Ang-Metaboliten. Neprilysin kann durch die Metalloprotease-Inhibitoren Thiorphan und Phosphoramidon inaktiviert werden.

1.5.4 Enzym-Inhibitoren

Amastatin

Der Aminopeptidaseinhibitor Amastatin wird aus dem Kulturfiltrat von *Streptomyces* sp. gewonnen. Er ist ein nichttoxischer kompetitiver Inhibitor der Aminopeptidase A, Aminopeptidase N, Aminopeptidase M und Leucin-Aminopeptidase (Wilkes et al. 1985) nicht jedoch der Aminopeptidase B (Nagata et al. 1991). Er potenziert die Wirkung zahlreicher biologisch aktiver Peptide durch Hemmung ihres Abbaus. Die Inhibition verläuft reversibel und langsam mit K_i -Werten von 4×10^{-8} M für Aminopeptidase N, 6×10^{-8} M für Leucyl Aminopeptidase (Wilkes et al. 1985) und 2×10^{-7} M für Aminopeptidase A (Tobe et al. 1980).

Bestatin

Bestatin wird von kultivierten *Streptomyces olivoreticuli* produziert und inhibiert zahlreiche Aminopeptidasen, darunter Aminopeptidase N, Aminopeptidase B, Leucin-Aminopeptidase, Alanin-Aminopeptidase (Müller et al. 1982). Es ist ein gering toxischer kompetitiver Inhibitor, der langsam und reversibel bindet, mit K_i -Werten zwischen $1,4 \times 10^{-6}$ M und $5,8 \times 10^{-10}$ M (Wilkes et al. 1985). Bestatin-sensitive Enzyme spielen eine wichtige Rolle im Verdauungstrakt, in der Niere, im Reproduktionssystem und in der Tumorgenese (Scornik et al. 2001; Saiki et al. 1993). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Bestatin antitumorösen und immunstimulatorischen Einfluss bei soliden Tumoren und hämatologischen Erkrankungen nimmt (Review in Ichinose et al. 2003).

PCI (Potato Carboxypeptidase Inhibitor)

Der Potato-Carboxypeptidase-Inhibitor (PCI) wird in Kartoffeln gebildet, besteht aus 39 Aminosäuren und wird durch Disulfidbrücken stabilisiert (Arolas et al. 2004). Er hemmt kompetitiv zahlreiche Carboxypeptidasen, sein K_i liegt im nanomolaren Bereich (Arolas et al. 2004). PCI besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), dessen Rezeptoren in vielen epithelialen Tumoren verstärkt exprimiert werden. PCI bindet kompetitiv an diese Rezeptoren und inhibiert deren Aktivierung und die daraus resultierende Zellproliferation (Blanco-Aparicio et al. 1993).

Thiorphan

Das Glycinderivat Thiorphan wurde 1980 als erster vollsynthetischer Metalloprotease-Inhibitor entwickelt. Er gilt als der derzeit spezifischste Inhibitor der Metalloprotease Neprilysin mit einem K_i von 3,5 nM (Roques et al. 1983). Darüber hinaus kann jedoch auch ACE durch Thiorphan gehemmt werden, wenn auch erst in deutlich höheren Konzentrationen ($K_i=140$ nM). Seine biologische Wirkung ergibt sich aus seinem Hemmspektrum: durch Inhibition von Neprilysin verstärkt er die analgetische und antinozizeptive Potenz von exogen zugeführten Opiaten und endogenen Enkephalinen (Glimcher et al. 1984). Darüberhinaus beeinflusst er auch die Regulation des Gefäßtonus durch Hemmung des Bradykinin-Abbaus und ACE-Inhibition (Krasso et al. 2003).

1.6 Zielsetzung

Das systemische Renin-Angiotensin-System ist eine Hormonkaskade, in deren Mittelpunkt die Bildung des vasoaktiven Peptids Ang II steht. Ang II ist durch direkte Vasokonstriktion, Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes sowie renale Natrium- und Wasserretention wesentlich an der Regulierung des Blutdruckes beteiligt. Auch verschiedene andere Organe, unter anderem das Fettgewebe, weisen lokale Renin-Angiotensin-Systeme auf, deren Reaktionswege und physiologisch bedeutende Angiotensin-Peptide sich teilweise vom „klassischen“ Renin-Angiotensin-System unterscheiden. Von besonderem Interesse ist das lokale Renin-Angiotensin-System des Fettgewebes im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom. Als metabolisches Syndrom wird die Kombination aus Adipositas, Bluthochdruck, Insulinresistenz, bzw. Diabetes mellitus und Hypertriglyceridämie bezeichnet, die ursächlich an der Pathogenese kardiovaskulärer und arteriosklerotischer Erkrankungen beteiligt ist. Allerdings ist bisher noch wenig bekannt über die Reaktionsabläufe, die physiologischen Funktionen und die beteiligten Enzyme des lokalen Fettgewebe-RAS. Ang II wurde bisher nur in geringen Mengen im Fettgewebe und in Zellkulturüberständen humaner Fettgewebszellen gefunden (Phillips et al. 1993; Schling et al. 2002), so dass es im Gegensatz zum systemischen RAS hier nicht die zentrale Rolle zu spielen scheint. Neben Ang II gibt es jedoch noch weitere Angiotensin-Peptide, von denen eine physiologische Funktion bekannt ist, insbesondere Ang-(1-7), Ang-(2-8) und Ang-(3-8) (Cesari et al. 2002).

Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Identifikation der lokal im Fettgewebe tatsächlich, bzw. in größeren Mengen gebildeten Angiotensin-Peptide, die damit möglicherweise die physiologisch bedeutenden Effektoren des humanen Fettgewebe-RAS sind, sowie der Nachweis von Bildung und Abbau des Angiotensinogens. Insbesondere sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Angiotensine werden durch humane Fettzellen aus Angiotensinogen gebildet?
- In welchen Konzentrationen entstehen sie relativ zueinander?
- Wie verhält sich der zeitliche Verlauf der Bildung und des Abbaus dieser Peptide?
- Welche Enzyme sind in humanen Präadipocyten und Adipocyten maßgeblich an der Bildung dieser Angiotensine aus Angiotensinogen und deren weiterem Abbau beteiligt?

- Wird Angiotensinogen von humanen Präadipocyten und Adipocyten gebildet und in das Medium sezerniert und ist diese Sekretion reguliert?

Hierzu soll folgendermaßen vorgegangen werden:

- Kultur und in vitro Differenzierung humaner Präadipocyten nach einer im Institut etablierten Methode; Bestimmung des Gesamtproteingehaltes nach Bradford; Bestimmung des Differenzierungsgrads anhand der Aktivität des Markerenzym Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase.
- Optimierung einer HPLC-Methodik (Schäfer 2001) zur Auftrennung und Identifizierung verschiedener Ang-Spaltprodukte.
- Inhibitorstudien zur Identifikation der am Abbau der Ang-Peptide beteiligten Enzyme.
- Bestimmung der endogenen Angiotensinogen-Produktion und -Sekretion, sowie der Kinetik des Abbaus exogen zugegebenen Angiotensinogens mittels immunologischem Nachweis und Western Blot.

2 Material

2.1 Geräte

Gerätetyp	Bezeichnung	Hersteller
Autoklaven	Autoklav 24 Fedegari Autoclavi Spa	Melag, Berlin Tecnomara, Baar (CH)
Blot-Apparatur	Trans Blot Cell	BioRad, München
Brutschränke		Heraeus, Hanau
Chemilumineszenz-Scanner	Lumi-Imager™-F1	Boehringer, Ingelheim
Gelkammer	MiniProtean II	BioRad, München
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
HPLC	alliance HT 2790 Separations Module	Waters GmbH, Eschborn
HPLC Absorbance Detector	2487 Dual λ Absorbance Detector	Waters GmbH, Eschborn
Lyophile / Speedvac	Alpha RVL	Christ, Osterode am Harz
Magnetrührer / Heizplatte	MR 3001	Heidolph, Schwabach
Phasenkontrastmikroskop	Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Photoentwickler	X-OMAT 2000 Processor	Kodak, Stuttgart
Photokammer	Biomax	Kodak, Stuttgart
Spannungsquellen	Power PAC 300 LKB EPS 500 / 400	BioRad, München Pharmacia, Erlangen
Sterilbank	Hera safe 15	Heraeus, Hanau
Ultraschallbad	Sonorex, RK	Bandelin, Berlin
Ultraschallstab	Soniprep 150 MSE	Beun de Ronde B. V., La Abcoude
Vortex	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Waage	MC 1 LC 4200	Sartorius, Goettingen
96-Well-Plate-Reader	Sunrise	Tecan, Crailsheim
Zentrifuge	Biofuge, pico	Heraeus, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung	Hersteller
Cryo Tubes	1 ml	Nunc, Langenselbold
Cups	1,5 ml und 2,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten	96-well-Platten	Nunc, Langenselbold
Photopapier	Hyperfilm ECL Highperformance Chemiluminescence film	Amersham Biosciences, Freiburg
Pipettenspitzen	10, 200 und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran	Immun-Blot PVDF Membran	BioRad, München
SDS-Gel	Ready Gel, 4-15% Tris HCL	BioRad, München
Sterilfilter	Glas Fibre Prefilters 0,22 µm	Millipore, Schwalbach /Ts
Whatman-Papier	Chromatography Paper 3 mm	Whatman, Dassel
Zellkulturflaschen	75 cm ²	Nunc, Langenselbold
Zellkulturschalen	10 cm ² und 60 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber		Sarstedt, Nümbrecht

2.3 Chemikalien und Lösungen

Nota bene: Basischemikalien wie anorganische Säuren, Laugen und klassische Solventien wurden als elementare Laborausstattung vorausgesetzt und daher nicht explizit aufgeführt.

2.3.1 Zellkultur

Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Amastatin	Calbiochem, Darmstadt
Angiotensin I (1-10) (des-Asp)-Angiotensin I (2-10) Angiotensin I (1-9), Angiotensin II (1-8) Angiotensin I/II (1-7), Angiotensin I/II (1-6) Angiotensin I/II (1-5), Angiotensin I/II (3-7) Angiotensin III (2-8), Angiotensin IV (3-8) Angiotensin I/II (4-8), Angiotensin I/II (5-8)	Bachem, Bubendorf
Angiotensinogen (human)	Calbiochem, Darmstadt
apo-Transferrin	Sigma, Deisenhofen
Bestatin	Calbiochem, Darmstadt
bFGF (human)	Tebu, Offenbach
Biotin	Serva, Heidelberg
BSA	Biomol, Hamburg
CaCl ₂	VWR (Merck), Darmstadt
Ca ²⁺ -D-Pantothenat	Sigma, Deisenhofen
Collagenase CLS Typ I	Biochrom AG, Berlin
Cortisol	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Biochrom AG, Berlin
DMEM/Ham's F-12 (1:1)	Biochrom AG, Berlin
DMSO	VWR (Merck), Darmstadt
FKS	Biochrom AG, Berlin
Glucose	VWR (Merck), Darmstadt
Hepes	Biochrom AG, Berlin
IBMX	Serva, Heidelberg
Insulin	Sigma, Deisenhofen
KCL	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
NaCl	Calbiochem, Darmstadt
PBS, steril	Gibco, Karlsruhe
PCI	Calbiochem, Darmstadt
Penicillin G	Biochrom AG, Berlin
Rosiglitazon	Calbiochem, Darmstadt
Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Thiorphan	Calbiochem, Darmstadt
Triiodothyronin	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Biochrom AG, Berlin

Puffer und Lösungen

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration als Medienzusatz
Amastatin	10 mM, 1 mg in 211 µl DMSO	100 µM
Angiotensine	10 mM, in PBS + 0,01 % BSA	1 mM
AGT	10 µM, 100 µg in 174 µl H ₂ O	100 nM (10 µl/ml)
apo-Transferrin	2 mg/ml in H ₂ O	2 µg/ml
Bestatin	10 mM, 10 mg in 3,24 ml Ethanol	100 µM
bFGF	10 µM in PBS/0,01 % BSA	1 nM
Biotin	1 mM in 0,16 M NaOH	1 µM
Ca ²⁺ -D-Pantothenat	17 mM, 4,05 mg/ml H ₂ O	17 µM
Cortisol	50 µM in EtOH p.A.	Wachstumsphase: 50 nM Differenzierungsphase: 100 nM
Glutamin	200 mM in 0,85% NaCl	2 mM
IBMX	25 mM, 5,55 mg/ml H ₂ O, Spatelspitze Na ₂ CO ₃ , im Ultraschallbad lösen	500 µM
Insulin	1 mM, 6 mg/ml in 30 mM HCl	1 µM
L-Glutamin	200 mM in 0,85 % NaCl	2 mM
PCI	200 µM, 5 mg in 5,95 ml SD ₆	100 µM
Penicillin	60 mg/ml H ₂ O = 100000 U/ml	100 U/ml
Rosiglitazon	500 µM in EtOH, p.A.	500 nM
Streptomycin	100 mg/ml H ₂ O	0,1 mg/ml
Thiorphan	1 mM, 5 mg in 19,74 ml H ₂ O	100 µM
Triiodothyronin	1 µM in H ₂ O	1 nM

Collagenase-Lösung: pro 2l H₂O

Hepes	47,60 g
NaCl	14,00 g
KCL	7,20 g
CaCl ₂	0,30 g
Glucose	1,98 g
BSA	1,5 %
Collagenase	0,1 %
sterilfiltriert, 0,22 µm-Filter	

SD₆-Medium:

DMEM / Ham's F-12 (3:1-Gemisch)	
+ Penicillin G	60 µg/ml
+ Streptomycin	100 µg/ml
+ apo-Transferrin	2 µg/ml
+ Insulin	1 µM
+ Biotin	1 µM
+ Pantothenat	17 µM
+ L-Glutamin	2 mM

Präadipocyten-Einfrier-Medium:

SD ₆ -Medium (s.o.)	
+ 10 % FKS	
+ 5 % DMSO	

Aussaat-Medium:

SD ₆ -Medium (s.o.)	
+ 10 % FKS	

Wachstums-Medium:

SD ₆ -Medium (s.o.)	
+ 1 nM bFGF	
+ 50 nM Cortisol	

Induktions-Medium (CITR-Differenzierung):

SD ₆ -Medium (s.o.)	
+ 100 nM Cortisol	
+ 500 µM IBMX	
+ 1 nM Triiodothyronin	
+ 500 nM Rosiglitazon	

Differenzierungs-Medium (CTR-Differenzierung):

SD ₆ -Medium (s.o.)	
+ 100 nM Cortisol	
+ 1 nM Triiodothyronin	
+ 500 nM Rosiglitazon	

2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
BSA	Biomol, Hamburg
PBS	Gibco, Karlsruhe
Phosphorsäure 85 %	VWR, Darmstadt
Serva Blue G-250	Serva, Heidelberg

Puffer und Lösungen

Bradford-Reagenz-Stammlösung:

0,3 g Serva Blue G-250 in
 60 ml Phosphorsäure (85 %) und
 30 ml Ethanol_{techn} (98 %) lösen
 → in Braunglas bei RT lagern

Bradford-Reagenz-Gebrauchslösung:

5 ml Stammlösung mit
 13,3 ml Phosphorsäure (85%) und
 6,7 ml Ethanol_{techn} (85 %) mischen,
 mit H₂O_{dest} auf 100 ml auffüllen

2.3.3 GPDH - Test

Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
EDTA (Titrplex III)	VWR, Darmstadt
DHAP	Sigma, Deisenhofen
Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
NADH	Roche, Grenzach-Wyhlen
Triethanolamin	VWR, Darmstadt

Puffer und Lösungen

Stammlösungen:

DHAP: 20 mM, 34,0 mg/10 ml in H₂O
 NADH: 12 mM, 85,1 mg/10 ml in H₂O
 Mercaptoethanol 5 mM, 3,5 ml/10 ml in H₂O

TRAM - Puffer:

14,92 g Triethanolamin in
80 ml H₂O mit HCL_{konz.} auf pH 7,5 einstellen
930,6 mg EDTA (Titriplex III) zugeben,
auf 100 ml mit H₂O auffüllen

Testmischung: eingesetzte Menge pro Well 160 µl:

20 µl	TRAM-Puffer
4 µl	Mercaptoethanol
4 µl	NADH
4 µl	DHAP
128 µl	H ₂ O

2.3.4 HPLC

Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril (HPLC-grade)	T.J.Baker, Deventer, Holland
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Triethylammonium-formiat (TEAF)	Fluka, Neu-Ulm
Natriumazid	Merck, Darmstadt

*Puffer und Lösungen***Puffer A:**

Ameisensäure: 30 mM
TEAF: 4 mM
Für 1 Liter:
Ameisensäure: 1,132 ml
TEAF: 0,405 ml
mit H₂O_{millipore} auf 1 Liter auffüllen

Puffer B:

100 % Acetonitril (CH₃CN)

Spülpuffer:

0,1 % Natriumazid (NaN₃)
in H₂O_{millipore}

Waschpuffer:

0,5 % Natriumdodecylsulfat (SDS)
in H₂O_{millipore}

Dichtungs-Waschpuffer:

10 % Methanol
in H₂O_{millipore}

2.3.5 SDS – Polyacrylamid Gelelektrophorese

Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Dithiothreitol (DTT)	Amersham Biosciences, Freiburg
Dodecylsulfat Na-Salz (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Merck, Darmstadt
Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard	Biorad, München
Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x)	Invitrogen, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, Deisenhofen

Puffer und Lösungen**Probenpuffer:**

Tris-Glycine SDS-DTT (Verhältnis SDS:DTT 1:10)
(Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x) 1:1 mit H₂O verdünnen)

Laufpuffer (10x):

Tris 30,34 g
Glycin 144,00 g
SDS 10,00 g
Mit H₂O auf 1 Liter auffüllen

2.3.6 Western Blotting und Immunologischer Proteinnachweis

Chemikalien, sofern nicht unter 2.3.4 aufgeführt

Chemikalie	Hersteller
1. AK: anti-humanen-Angiotensinogen	freundlicherweise von Dr. Philip G. McTernan, Queen Hospital, Birmingham, UK zur Verfügung gestellt
2. AK: Peroxidase – conjugated Affini Pure F(ab')	dianova, Hamburg
2 Fragment Rabbit Anti-Goat IgG (H+L),	
ECL-plus Chemiluminescence Reagenz	Amersham Biosciences, Freiburg
Normal Rabbit Serum (NRS)	dianova, Hamburg
Tween-20	Calbiochem, Darmstadt

Puffer und Lösungen

Transferpuffer:

Glycine (96 mM) 7,2 g
Tris (12 mM) 1,5 g
MeOH p.A. 100 ml
auf 1 l mit H₂O verdünnen

Waschpuffer:

PBS / 0,1 % Tween 20

Blockierlösung:

PBS / 0,1 % Tween 20
+ 5 % Milchpulver
+ 1 % NRS

AK-Aufbewahrungspuffer:

PBS
+ 10 % BSA
+ 1 % Na-Azid 10 %
+ 1 % PBS / 0,1 % Tween 20 (Waschpuffer)

1. AK: Anti-humanen–Angiotensinogen:

1:100 in PBS / 0,1 % Tween 20
+ 1 % Milchpulver
oder in Aufbewahrungspuffer

AK: Anti-Goat:

1:40000 in PBS/0,1% Tween 20
+1 % Milchpulver

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Isolation von primären Präadipocyten aus humanem Fettgewebe

Die Präadipocyten wurden aus humanem subkutanem Fettgewebe isoliert, das bei plastisch reduktiven Eingriffen gewonnen wurde. Das Fettgewebe wurde mit der Schere von Haut, Blutgefäßen und Bindegewebe befreit, zerkleinert und gewogen. Die Gewebestücke wurden daraufhin in sterile Collagenaselösung (1 ml / g Fettgewebe) überführt und 1 - 4 h im Wasserbad (37 °C, unter Schütteln) inkubiert. Nach Abschluss des Collagenase-Verdau wurde die Zellsuspension zur Entfernung unverdauter Gewebereste filtriert (250 µm-Filter), mit PBS 1:2 verdünnt und eine Weile ruhen gelassen. Dabei kam es zur Phasentrennung, wobei sich die Adipocyten als frei flottierende Fettschicht an der Oberfläche absetzten und abgesaugt wurden. Die verbliebene Zellsuspension wurde ein zweites Mal filtriert (30 µm-Filter), um noch vorhandene Zellverbände und Kapillarreste, zu entfernen, und anschließend 7 min bei 700 x g (= 2000 upm) und 37 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet (Stromazellen und Erythrocyten) in Präadipocyten-Einfriermedium resuspendiert (1 ml / 25 g präpariertes Gewebe), auf Cryocups verteilt (1 ml / Cup) und über Nacht bei -80 °C in einer Styroporbox inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Cryocups in flüssigen Stickstoff überführt und bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Aussaat neuer Zellen

Die Präadipocyten, die in Cryocups in flüssigem Stickstoff gelagert waren, wurden im Wasserbad so schnell als möglich auf 37 °C erwärmt, in Aussaat-Medium (SD₆ + 10 % FKS; 10 ml / Cup) aufgenommen und auf 75 cm²-Kulturflaschen verteilt (1-2 Cups / Flasche). Im Brutschrank hefteten sich die Präadipocyten über Nacht am Flaschenboden an.

Kultur und Differenzierung humaner Fettzellen

Ein bis zwei Tage nach Aussaat wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, um nicht adhärente Zellen (v. a. Erythrocyten) und Zellfragmente zu entfernen. Daraufhin

erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel mit Aussaatmedium, bis die Zellen nach etwa drei bis fünf Tagen mindestens 70 % konfluent waren (mikroskopische Kontrolle). Nach erneutem zweimaligen Waschen mit je 10 ml PBS wurden dann pro Flasche 3-5 ml Trypsin hinzugefügt, wodurch die adhärennten Zellen vom Flaschenboden abgelöst wurden. Nach kurzer Inkubation (ca. 5 min) wurde die Zellsuspension in eine vorher abgemessene Menge serumhaltigen Aussaat-Mediums überführt, das das Trypsin neutralisierte, und auf Zellkulturschalen verteilt. Die neue Kulturfläche sollte dabei max. dreimal größer sein als zuvor. Je nach geplantem Experiment wurden entweder 10 cm²-Schalen (2 ml Medium / Schale) oder 60 cm²-Schalen (10 ml Medium / Schale) verwendet. Da humane Präadipocyten in Medium mit mehr als 1 % FKS schon nach wenigen Tagen ihre Fähigkeit zur adipogenen Konversion verlieren, erfolgte nach zwei oder drei Tagen die Umstellung auf serumfreies Wachstumsmedium (SD₆ + 1 nM bFGF + 50 nM Cortisol). Es erfolgte weiterhin alle zwei bis drei Tage bis zur Konfluenz der Zellen ein Mediumwechsel. Ab diesem Zeitpunkt wurde je nach Differenzierungsabsicht unterschiedlich verfahren:

a) **Präadipocyten:** Zellen, die in einem undifferenzierten, nicht verfettenden Stadium verbleiben sollten (sogenannte Präadipocyten), wurden auf reines SD₆-Medium umgestellt, bis sie etwa 14 Tage später geerntet wurden. Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

b) **Adipocyten:** Um eine adipogene Konversion der humanen Präadipocyten zu erreichen, wurden diese für drei Tage in Induktions-Medium (SD₆ + 100 nM Cortisol, 500 µM IBMX, 1 nM Triiodothyronin, 500 nM Rosiglitazon) inkubiert und anschließend auf IBMX-freies Differenzierungs-Medium umgestellt. Nach drei bis fünf Tagen hatten die Zellen erste, mikroskopisch sichtbare Lipidtröpfchen im Cytosol eingelagert und zum Zeitpunkt ihrer Ernte nach 14 Tagen waren etwa 70 % der Zellen zu Adipocyten differenziert. Mediumwechsel erfolgte ebenfalls alle zwei bis drei Tage.

Zur Konsolidierung meiner Experimente wurde als einheitlicher Zeitpunkt $t = 14$ Tage nach Konfluenz als Beginn der Zellexperimente gewählt.

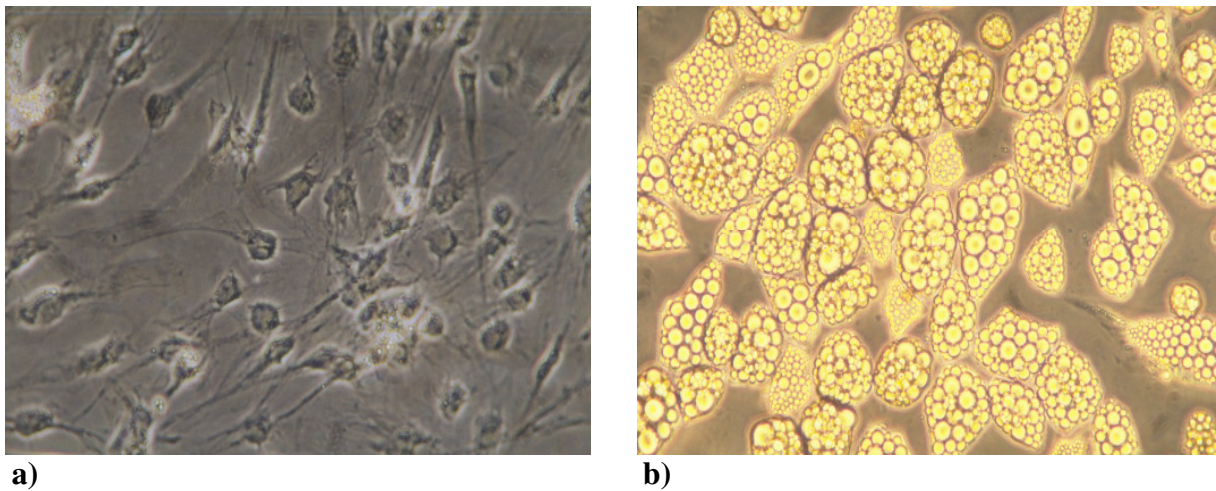


Abbildung 3: Konfluente Präadipocyten und Adipocyten

- a) undifferenzierte Präadipocyten zum Zeitpunkt der Experimente
- b) lipidhaltige multivakuoläre Adipocyten 14 Tage nach Induktion der adipogenen Konversion durch Zugabe von Cortisol, IBMX, Triiodothyronin und Rosiglitazon.

Verwendete PA- und A-Populationen

<u>Präp. Nr</u>	<u>Kürzel</u>	<u>Geschlecht</u>	<u>Alter</u>	<u>Entnahmeort</u>
1	612	w	39	Oberschenkel
2	619	w	54	Bauchdecke
3	621	w	33	Bauchdecke
4	622	w	38	Oberschenkel
5	624	w	71	Bauchdecke
6	625	w	40	Bauchdecke
7	632	w	70	Bauchdecke
8	637	w	31	Oberschenkel
9	638	w	49	Bauchdecke
10	640	w	51	Bauchdecke
11	642	m	31	Bauchdecke
12	643	m	29	Mamma
13	649	w	48	Mamma

Tabelle 1: Spenderdaten der Präadipocyten und Adipocyten

Von den Fettgewebsspendern war das Alter, das Geschlecht, sowie die Art des reduktiven Eingriffs und damit der Entnahmeort des Gewebes bekannt. Oben stehende Tabelle gibt eine Übersicht über die in den Experimenten verwendeten Präparationen.

Zelllyse

Nach Beendigung der Zellexperimente wurde das restliche Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden sie in 500 µl (10 cm²-Schalen), bzw. 1000 µl (60 cm²-Schalen) PBS abgeschabt, per Ultraschall lysiert und die spezifische Aktivität mittels GPDH-Messung, sowie der Proteingehalt nach Bradford bestimmt.

3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Um den Proteingehalt der Zelllysate zu bestimmen, wurde eine erstmals von M. Bradford (Bradford 1976) beschriebene Methode verwendet, die im Gegensatz zu vielen anderen Assays weniger empfindlich gegen störende Ionen und Reduktionsmittel ist. Sie beruht auf der Beobachtung, dass die Bindung von Serva Blue G-250 an Proteine in saurem Milieu zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm führt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm, die sich in einem sichtbaren Farbumschlag zeigt, ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Um den Proteingehalt quantifizieren zu können, wurde eine Standardreihe mit BSA in PBS in folgenden Konzentrationen erstellt:

0 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml.

In eine 96-Well-Platte wurden pro Well je 100 µl Standard (in Doppelbestimmung) oder Probe (Zelllysate in PBS) pipettiert. Die Proben waren hierbei je nach erwartetem Proteingehalt entweder unverdünnt oder 1:2 mit PBS verdünnt. Nach Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz-Gebrauchslösung pro Well wurde die Extinktion bei 620 nm innerhalb der nächsten 5 min gemessen und die Konzentration mit der Magellan-Software berechnet.

3.3 GPDH-Test

Die Differenzierung von Präadipocyten zu Adipocyten hat eine sukzessive Verfettung zur Folge. Ein Schlüsselenzym der Triglycerid-Synthese und damit einer der sensitivsten und präzisesten Marker der frühen adipogenen Konversion ist Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH). Dieses intrazelluläre Enzym katalysiert die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerol-3-Phosphat und wird bei der Ultraschalllyse der Zellen freigesetzt.

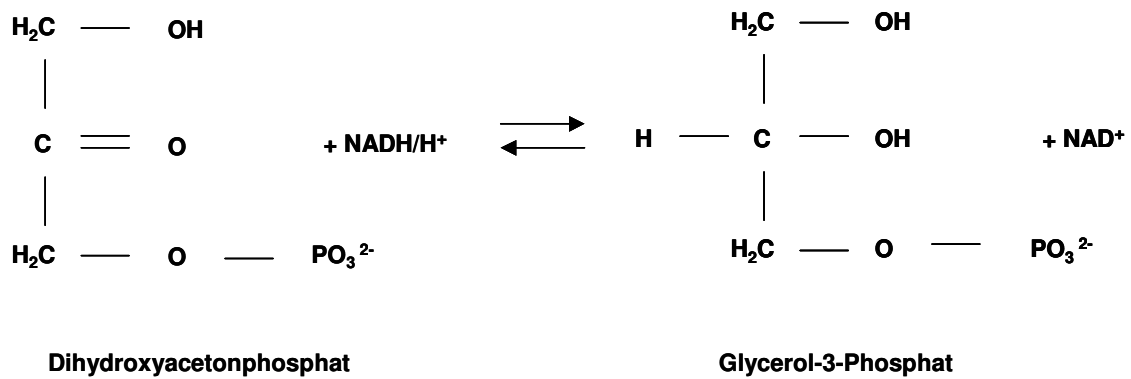


Abbildung 4: Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerol-3-Phosphat durch GPDH, ein Schlüsselenzym der Triglycerid-Synthese

Um die Aktivität der GPDH zu messen, die in den ersten ca. 20 Tagen proportional mit der sukzessiven Fetteinlagerung ansteigt, wurde auf eine Methode von J. Pairault und H. Greene zurückgegriffen (Pairault et al. 1979). Diese beruht auf einer Extinktionsabnahme des Reaktionsgemisches nach der Oxidation des CoSubstrates NADH/H^+ zu NAD^+ , die photometrisch bei 340 nm erfasst werden kann. In einer 96-Well-Platte wurden pro Well folgende Volumina eingesetzt:

40 µl Probe (Zelllysats in PBS, s.o., bzw. reiner PBS als Kontrolle), Start der Reaktion mit Testmischung (Gesamtvolumen 160 µl, siehe 2.3.3)

Gemessen wurde die Extinktionsänderung durch Abnahme des Substrates NADH mit einem Elisa-Reader bei 340 nm in 21 Cyclen von je 15 sec Dauer, wobei als Leerwert reines PBS statt des Zelllysates dem Testgemisch zugefügt wurde.

Um Unterschiede in der Dichte des geernteten Zellrasens als Grund für geänderte GPDH-Aktivität auszuschließen, wurde die gemessene Volumenaktivität auf den Proteingehalt des jeweiligen Zelllysats normiert. Der Proteingehalt wurde mittels Bradford-Bestimmung ermittelt (siehe 3.2).

Die so berechnete spezifische GPDH-Aktivität ist dann ein Maß für den Differenzierungsgrad.

Die spezifische Aktivität der GPDH im Zelllysate wurde nach folgender Formel berechnet:

$$A_{\text{spez}} = \frac{\Delta E * V_{\text{Küvette}}}{\Delta t * d * \epsilon} * V_{\text{Probe}}^{-1} * \text{Proteingehalt}^{-1}$$

Konstanten:	V_{Probe}	40 μl
	$V_{\text{Küvette}}$	200 μl
	$d_{\text{Küvette}}$	0,606 cm
	ϵ (NADH/ H^+) _{340 nm}	6,22 ml / $\mu\text{mol} * \text{cm}$

3.4 Abbaukinetiken und Inhibitorversuche

Für die Abbau- und Inhibitorkinetiken wurden die Zellen, wie in 3.1 beschrieben, in 10 cm²-Schälchen kultiviert und differenziert. Am 14. Tag nach Erreichen der Konfluenz erfolgte ein letzter Mediumwechsel mit Zugabe von 1 mM eines Angiotensin-Peptids in 1 ml SD₆-Medium. Folgende käuflich erwerbbare Ang-Peptide wurden verwendet: Ang-(1-10), -(1-9), -(1-7), -(1-6), -(1-5), -(2-10), -(2-8), -(3-7), -(3-8), -(4-8) und -(5-8). Für die Inhibitorkinetiken wurde den PA und A zusätzlich zu 1 mM des jeweiligen Angiotensins 100 μM eines Enzym-Inhibitors (siehe Tabelle 4) zugesetzt. Als Kontrollgruppe dienten PA und A derselben Populationen, die bis auf die Zugabe der Inhibitoren identischen Versuchsbedingungen ausgesetzt waren. Um die Ausgangskonzentration des jeweiligen Angiotensins bestimmen zu können, wurden direkt nach Zugabe von Peptid und Inhibitor 50 μl des Überstandes abpipettiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt. Weitere Probenentnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten 3, 6, 24 und 48 Stunden. In der Zwischenzeit lagerten die Zellen bei 37 °C im Brutschrank. Um etwaige ablaufende Enzymreaktionen zu stoppen, wurden die Proben direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Beendigung des Experimentes wurden die Zellen lysiert (siehe 3.1) und ihr Protein-Gehalt (siehe 3.2), sowie die GPDH-Aktivität (siehe 3.3) bestimmt. Die eingefrorenen Überstände wurden wie in 3.5 beschrieben, weiterverarbeitet und ihr Peptid-Gehalt mittels HPLC untersucht. Die in der relativen Einheit der HPLC erhaltenen Werte wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Hilfe von individuellen Standardgeraden (siehe 4.1.4) in μM umgerechnet. So konnten die einzelnen Angiotensine miteinander verglichen werden. Die Werte der hydrolysierten und neu synthetisierten Angiotensine zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurden für PA und A gemittelt und als Prozentwert des 0 h-Wertes des eingesetzten Peptids berechnet. Neu

entstandene Peptide, die nicht eindeutig vorher untersuchten Ang-Peptiden zugeordnet werden konnten, wurden in der relativen Einheit der HPLC belassen. Zur Ermittlung der signifikanten Unterschiede im Hydrolyse- und Syntheseverhalten zwischen Präadipocyten und Adipocyten, sowie inhibierten Zellen und Kontrollgruppen, wurden die individuellen Werte zu den jeweiligen Zeitpunkten im Students t-Test miteinander verglichen.

Die folgenden Tabellen stellen die verwendeten PA- und A-Populationen, sowie die zugesetzten Inhibitoren für die einzelnen Versuche dar.

<u>Ang-Peptid</u>	<u>verwendete Präparationen</u>
Ang-(1-10)	1; 2; 3; 8; 11; 13
Ang-(2-10)	1; 4; 6; 8; 11; 13
Ang-(1-9)	8; 11; 13
Ang-(2-8)	1; 3; 6; 7; 8; 10; 11; 13
Ang-(3-8)	1; 2; 4; 6; 8; 10; 11; 13
Ang-(4-8)	4; 5; 6
Ang-(5-8)	4; 5; 6
Ang-(1-7)	2; 4; 5; 6
Ang-(3-7)	4; 5; 6
Ang-(1-6)	4; 5; 6
Ang-(1-5)	4; 5; 6

Tabelle 2: In den Abbaukinetiken verwendete PA- und A-Präparationen

Zuordnung zu den Spenderdaten siehe Tabelle 1

<u>Ang-Peptid</u>	<u>verwendete Präparationen</u>
Ang-(1-10)	8; 11; 13
Ang-(2-10)	8; 11; 13
Ang-(1-9)	8; 11; 13
Ang-(2-8) Bestatin	8; 11; 13
Amastatin	10;13
Ang-(3-8) Bestatin	8; 11; 13
Amastatin	10;13

Tabelle 3: In den Inhibitorversuchen verwendete PA- und A-Präparationen

Zuordnung zu den Spenderdaten siehe Tabelle 1

<u>Angiotensin</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Inhibitor</u>
Ang-(1-10)	100 μ M	Thiorphan
Ang-(2-10)	100 μ M	PCI
Ang-(1-9)	100 μ M	Thiorphan
Ang-(2-8)	100 μ M	Bestatin (1. Versuchsreihe)
	100 μ M	Amastatin (2. Versuchsreihe)
Ang-(3-8)	100 μ M	Bestatin (1. Versuchsreihe)
	100 μ M	Amastatin (2. Versuchsreihe)

Tabelle 4: Verwendete Inhibitoren

Die Abbau- und Inhibitorkinetiken wurden, sofern nicht anders angegeben, für jedes Ang-Peptid an PA und A dreier verschiedener Populationen untersucht. Die nicht inhibierten Kontrollgruppen der Inhibitorkinetiken der Angiotensine (1-10), (1-9), (2-10), (2-8) und (3-8) wurden in die Berechnung der jeweiligen Abbaukinetiken mit einbezogen, um so eine höhere Fallzahl und bessere Aussagekraft zu erreichen.

3.5 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Die High Performance Liquid Chromatography diente der chromatographischen Auftrennung verschiedener Angiotensine und deren Abbauprodukten. Die zu untersuchende Lösung (in diesem Fall Zellüberstände nach Inkubation mit Angiotensinen) wurde zusammen mit einem flüssigen Laufmittel, der „mobilen Phase“, durch eine Trennsäule (silanisierte Kieselgelkügelchen), die „stationäre Phase“, gepumpt. Durch unpolare und hydrophobe Anteile der mobilen Phase bestehen Wechselwirkungen mit der hydrophoben Trennsäule. Je nach Intensität dieser Wechselwirkungen kommt es zu einer unterschiedlich langen Verweildauer der einzelnen Peptide auf der Säule (Retentionszeit) und dementsprechend zu ihrer Auftrennung. Am Ende der Säule werden die Peptide mit einem UV-Detektor nachgewiesen. Die Auftrennung erfolgte an einer RP₁₈-Säule nach einer modifizierten Methode von Naik & Moe (Naik et al. 2000) und T. Schäfer

(Schäfer et al. 2001) unter Verwendung eines Wasser-Acetonitril-Gradienten, d. h. die Polarität des Fließmittelgemisches wurde während der Analyse verändert.

Aufarbeitung der Proben

Nach Kultur und Differenzierung der Zellen, wie in 3.1 dargestellt, erfolgte am 14. Differenzierungstag ein letzter Mediumwechsel mit Zugabe von 1 ml SD₆-Medium mit je 1 mM eines Angiotensins, gegebenenfalls kombiniert mit 100 µM eines Inhibitors pro Schale. Zu vorher fest gelegten Zeitpunkten wurden jeweils 50 µl Überstand abgenommen und zur Beendigung ablaufender Hydrolysevorgänge in flüssigem Stickstoff vorübergehend schockgefroren. Zur Aufreinigung der Proben von Makromolekülen, v. a. Proteinen wurden pro 50 µl Probe 200 µl Ethanol zugegeben, 1 min gevortext und 15 min bei maximaler Umdrehung (13 000 upm) abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein frisches Cup überführt, etwa 2 h in der Speedvac eingedampft und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Das so gewonnene Lyophilisat wurde am Tag der HPLC-Analyse in 50 µl Puffer A resuspendiert und in Probe-Fläschchen zur automatischen Injektion gefüllt. Neben den beschriebenen Zellüberständen wurden auch Angiotensine ohne Zellkontakt in SD₆-Medium und reines SD₆-Medium nach obiger Aufarbeitung analysiert.

Inbetriebnahme der Apparatur / Einschalt routine

Zunächst wurden die elektrischen Komponenten (Computer, Detektor und Basisstation) eingeschaltet, das Gerät mit dem Computer verbunden und die Laufpuffer aufgefüllt. Anschließend wurden die Leitungen mit beiden Puffern gespült (7,5 ml / min), bis keine Luftblasen mehr zu sehen waren. Ab diesem Zeitpunkt war das System betriebsbereit. Die Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Millenium von Waters.

Gerätekonstanten

Säule	=	LiChroCart [®] 125-4 Purospher RP ₁₈ , 5 µm
Säulentemperatur	=	25°C
Flussrate	=	5,00 ml/min
Gegendruck	=	ca. 150 PSI bei 100 % Puffer A (wässrig) ca. 50 PSI bei 100 % Puffer B (Acetonitril)
$\lambda_{\text{Detektion}}$	=	190 nm und 232 nm
$t_{\text{Injektion}}$	=	automatische Injektion zum Zeitpunkt 0,00 min
$V_{\text{Injektion}}$	=	20 µl

Proben-Programm

<u>time</u>	<u>flow</u>	<u>% A</u>	<u>% B</u>
0,00	1,00	100	0
3,00	1,00	100	0
6,00	1,00	90	10
10,00	1,00	90	10
40,00	1,00	83	17
45,00	1,00	82	18
50,00	1,00	82	18
55,00	1,00	0	100
57,00	1,00	0	100
62,00	1,00	100	0
65,00	1,00	100	0

Endprogramm

<u>time</u>	<u>flow</u>	<u>% A</u>	<u>% B</u>
	1,00	100	0
1,00	1,00	100	0
2,00	1,00	0	100
4,00	1,00	0	100

3.6 SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Zum Nachweis von Synthese und Abbau von Angiotensinogen (AGT) wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli et al. 1970) mit anschließendem Western Blot (siehe 3.7) und Immunnachweis (siehe 3.8) angewandt. Hierbei werden die zu untersuchenden Molekülgemische in die Geltaschen eines Polyacrylamid-Gels aufgetragen und wandern anschließend unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes durch das Gel, das sich in einer Pufferlösung befindet. Je nach Größe, bzw. Länge der Polypeptidketten bewegen sich die Moleküle unterschiedlich schnell und werden dadurch aufgetrennt, wobei das Gel als engmaschiges Molekularsieb fungiert. Es wurden Gradientengele (4 - 12%) der Firma Biorad verwendet.

Die Proben für AGT-Synthese und -Abbau wurden jeweils unterschiedlich vorbereitet:

AGT-Abbau: Die Zellen wurden wie in 3.1 beschrieben, kultiviert und differenziert. 24 Stunden vor Beginn des Experimentes wurden sie auf reines SD₆-Medium umgestellt, um den Effekt von CTR auf die A zu minimieren. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und zu jeder 10 cm²-Kulturschale PA und A 1,5 ml SD₆-Medium mit 10 µg/ml AGT (ca. 0,174 µM) zugegeben. Zu den vorher festgelegten Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h und 48 h wurden jeweils 100 µl Überstand abgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das nach der letzten Probenentnahme verbliebene Medium wurde ebenfalls gesammelt und schockgefroren. Die Zellen wurden nach Beendigung des Experimentes wie in 3.1 beschrieben, lysiert und Proteingehalt und GPDH-Aktivität bestimmt. Vor Durchführung der Gelelektrophorese wurden die zu Ende des Experimentes gesammelten Mediumreste aufgetaut, gepoolt und nach kurzem Vortexen in 100 µl-Portionen aufgeteilt, von denen jeweils eine als 100 %-Mix mit den gewonnenen Proben aufbereitet und auf das Gel aufgetragen wurde. Den 100 µl-Proben wurden jeweils 100 µl Methanol und 25 µl Chloroform zugegeben, um die Proteine auszufällen. Nach 5 min Zentrifugation bei 13 000 upm bei RT bildeten sich zwei Phasen, zwischen denen sich die ausgefallenen Proteine sammelten. Die obere Phase wurde verworfen, zum Rest 75 µl Methanol zugegeben und ein zweites Mal 5 min bei 13 000 upm und RT zentrifugiert, wobei die Proteine ein Pellet am Boden bildeten. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet.

AGT-Synthese: Die Zellen wurden ebenfalls gemäß 3.1 vorbereitet und am Vortag des Experimentes auf reines SD₆-Medium umgestellt. 24 h später erfolgte ein letzter

Mediumwechsel mit Zugabe von 10 ml reinen SD₆-Mediums je 60 cm²-Kulturschale. Zu den vorher festgelegten Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h und 48 h wurden jeweils 800 µl Überstand abgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach Beendigung des Experimentes wurde ebenfalls das verbliebene Medium gesammelt, gepoolt und zum Erhalt der 48 h-Mix-Proben auf 800 µl-Portionen verteilt. Vor Durchführung der Gelelektrophorese wurden die Proben aufgetaut und in der Speedvac bis zur Trockne lyophilisiert, was bis zu 10 h dauern konnte.

Um eine Auftrennung der Moleküle nur entsprechend ihrer Größe und nicht ladungsabhängig zu erreichen, wurden die Pellets in 20 µl 1-fachem SDS-DTT-Probenpuffer gelöst. SDS (Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergens, das als Denaturierungsmittel fungiert, indem es an Proteine bindet und deren Eigenladung überdeckt. Durch die Zugabe von DTT (Dithiothreitol) kam es zusätzlich zur Spaltung der Disulfidbrücken durch deren Reduktion. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 70 °C denaturiert und 3 min bei 13 000 upm bei RT zentrifugiert. Es wurden 20 µl Probenvolumen pro Spur aufgetragen, eine Spur wurde mit 10 µl Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard von Biorad belegt. Der Lauf erfolgte in einer "Mini Protean II" Apparatur (Biorad) bei 25 mA pro Gel für ca. 1¾ h (bis zum Auslaufen des Farbstoffes).

3.7 Western Blotting

Die Methode des Western Blottings (Towbin et al. 1979) dient der Übertragung der auf dem SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran, wo sie durch spezifische Antikörper sichtbar gemacht werden können. Das Gel wird in einer speziellen Blot-Apparatur auf die PVDF-Membran aufgelegt (siehe Abbildung 5) und in einer Pufferlösung in einem elektrischen Feld inkubiert. Dabei wandern die negativ geladenen Proteine vom Gel zur positiv geladenen Anode und werden somit auf die Membran übertragen. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 20 V und 15 °C mit angeschlossener Kühlvorrichtung.

Da ein *Kaleidoscope* Standard verwendet wurde, der bereits ohne Färbung sichtbar ist, musste die Standard-Spur nicht weiter behandelt werden.

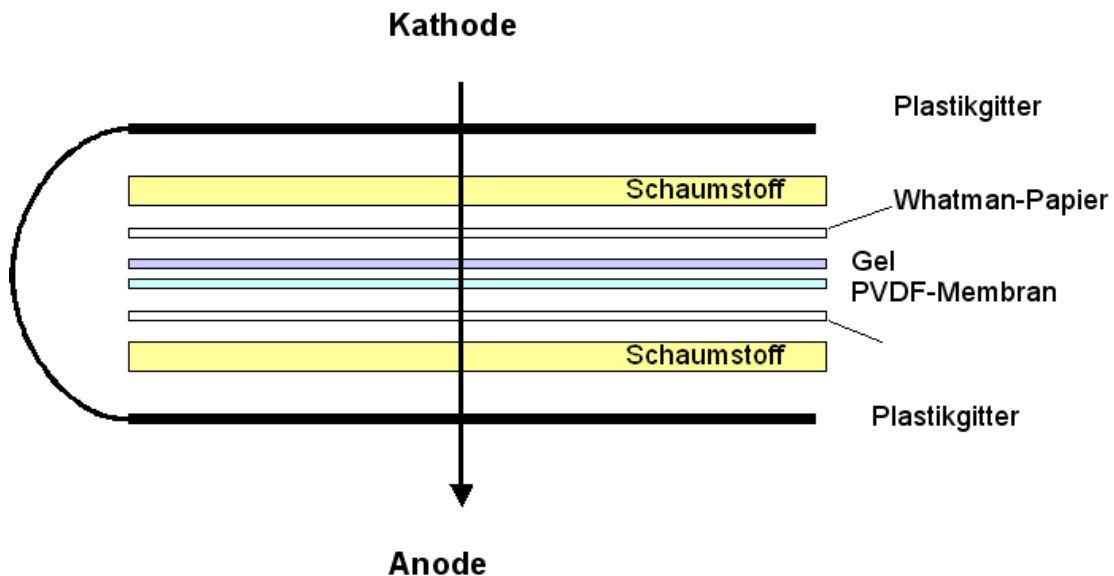


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Western-Blot-Vorrichtung

3.8 Immunologischer Proteinnachweis

Die auf der PVDF-Membran befindlichen Protein-Banden können mittels spezifischer Primärantikörper markiert werden. In einem zweiten Inkubationsschritt werden Sekundärantikörper hinzugegeben, die gegen den ersten Antikörper gerichtet sind und mit einem Enzym, in diesem Falle Peroxidase, gekoppelt sind. Gibt man nun ein geeignetes Substrat hinzu, kommt es zu einer Farb- oder Chemilumineszenz-Reaktion, die sichtbar gemacht werden kann. Der Primärantikörper, anti-humanen-Angiotensinogen, wurde freundlicherweise von Dr. Philip G. McTernan, Queen Hospital, Birmingham, UK zur Verfügung gestellt.

Nachdem der Blot-Prozess abgeschlossen war, wurde die Membran für eine Stunde in Blockierlösung gelegt, die 5 %ige Milchpulverlösung enthielt, um die Stellen der Membran, die kein Protein enthalten, abzusättigen. So wurde vermieden, dass der Primärantikörper nicht-spezifisch binden kann und falsch positive Ergebnisse erzeugt. Daraufhin wurde die Membran eine Stunde lang mit dem spezifischen Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 entweder in 1 %iger Milchpulverlösung oder in Aufbewahrungslösung unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Die Aufbewahrungslösung wurde verwendet um AK zu sparen, wenn an einem Tag mehr als ein Gel mit dem anti-humanen-Angiotensin-AK geplant war. Die Ergebnisse nach Inkubation des Primärantikörpers in 1 %iger Milchpulverlösung und in

Aufbewahrungslösung waren identisch, wie in einem Testlauf bewiesen wurde. Die ungebundenen Antikörperreste wurden in einem 30 minütigen Waschschrift mit mehrmaligem Wechsel des Waschpuffers entfernt und der zweite, Peroxidase-gekoppelte Antikörper (Anti-Goat-AK) in einer Verdünnung von 1:40000 in 1 %iger Milchpulverlösung zugegeben. Wiederum wurde eine Stunde unter Schwenken inkubiert und anschließend nicht gebundene Sekundärantikörper in einem weiteren 30 minütigen Waschschrift abgewaschen. Zur Detektion der mit Antikörpern markierten Proteinbanden, wurde die Membran für 5 min mit ECL-Chemiluminescence-Reagenz von Amersham, Biosciences bedeckt. Die dabei erfolgte Chemilumineszenz-Reaktion zwischen der Peroxidase und dem Substrat konnte durch Schwärzung eines Röntgenfilms an den Stellen der Proteinbanden nach einigen Sekunden Exposition sichtbar gemacht werden. Zusätzlich wurden die Membranen zur Quantifizierung der Banden mit dem Lumi-Imager der Firma Boehringer analysiert.

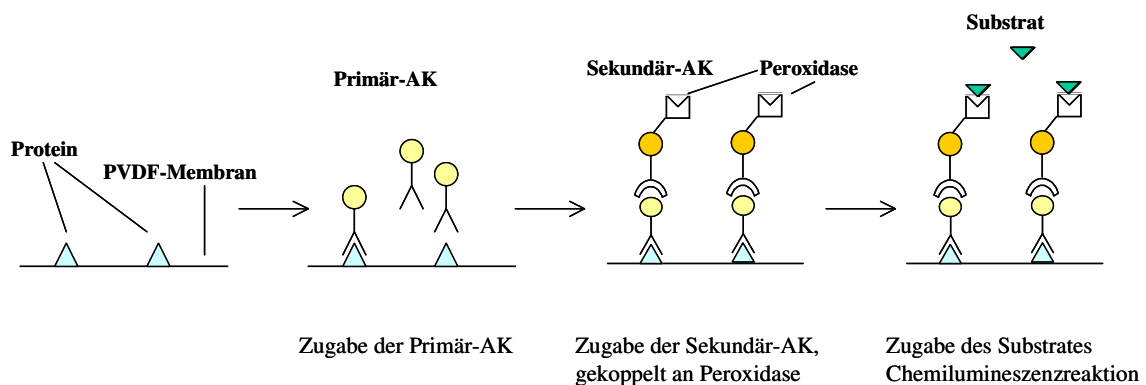


Abbildung 6: Schema des immunologischen Proteinnachweises

4 Ergebnisse

4.1 HPLC-Vorversuche

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ist ein sehr sensitives und spezifisches Verfahren zur Auftrennung verschiedenster, auch sehr ähnlicher Peptide. Mit ihrer Hilfe können einzelne Angiotensine und ihre Spaltprodukte in einer Probe ohne Kreuzreaktionen identifiziert werden. Es wurde nach einer modifizierten Methode von Naik & Moe (Naik et al. 2000) und T. Schäfer (Schäfer et al. 2001) verfahren (siehe 3.5).

4.1.1 Vorbereitung

Um die aufgetretenen Peaks auch eindeutig den jeweiligen Angiotensinen zuordnen zu können, musste zuerst das Muster des SD₆-Mediums allein erforscht werden. Da dieses aus zahlreichen Inhaltsstoffen (AS, Zucker, Salze, Proteine u.a.) besteht, war ein deutlicher Hintergrund zu erwarten. Hier konnte freundlicherweise auf die Versuche von T. Schäfer (Schäfer et al. 2001) zurückgegriffen werden, der mit SD₆-Medium der gleichen Zusammensetzung arbeitete und dieses bereits ausführlich untersucht hatte. Seine Untersuchung des reinen Mediums ohne Zellkontakt ergab drei distinkte Peaks mit Retentionszeiten von 11,6 min, 15,7 min und 19,3 min, bei denen es sich vermutlich um Inhaltstoffe des Basismediums (eine käufliche 3:1-Mischung aus DMEM / Ham's F-12) handelt. Diese Peaks fanden sich aufgrund der veränderten Laufzeiten bei meinen Versuchen zu den Zeitpunkten 12 min, 27 min und 42 min. Weiterhin konnte T. Schäfer nachweisen, dass dieser Hintergrund über eine Dauer von 72 h konstant blieb und sich auch nach Inkubation auf Präadipocyten und Adipocyten keine weiteren Sekretionsprodukte detektieren ließen (Schäfer et al. 2001). Jedem HPLC-Lauf wurde die Untersuchung einer Probe reinen SD₆-Mediums vorangestellt, um Beeinträchtigungen, bedingt durch mögliche Verunreinigungen der Säule oder des Laufmittels, auszuschließen. Im Gegensatz zu der von Naik und Moe (Naik et al. 2000) verwendeten Detektionswellenlänge $\lambda=232$ nm, lag bei meinen eigenen Untersuchungen das Absorptionsmaximum der meisten Ang-Peptide bei 190 nm.

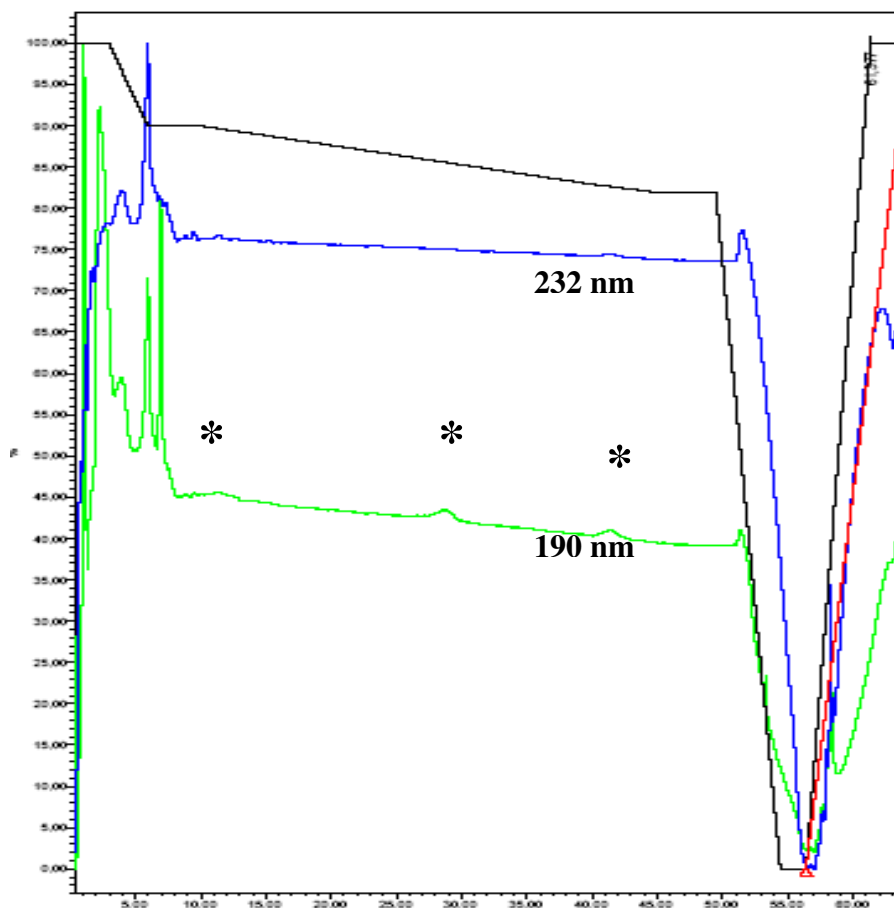


Abbildung 7: Muster des SD₆-Mediums im HPLC-Lauf

Dargestellt sind die drei distinkten Peaks (*) mit einer Retentionszeit von 12, 27 und 42 min des SD₆-Mediums, die durch Inhaltsstoffe des Mediums entstehen. Um Beeinträchtigungen durch externe Störfaktoren auszuschließen, wurde jedem HPLC-Lauf eine Probe reinen SD₆-Mediums vorangestellt. Die blaue Kurve entspricht der Detektionswellenlänge 232 nm, die grüne 190 nm. Die schwarze Kurve stellt den Acetonitril-Gradienten dar.

4.1.2 Bestimmung der Retentionszeiten

Als nächstes wurde durch Einsatz verschiedener Konzentrationen der Ang-Peptide ermittelt, ob und bis zu welcher Konzentration jedes Ang-Peptid durch einen distinkten Peak wiedergefunden werden konnte. Tabelle 5 stellt die ermittelten Retentionszeiten für die einzelnen Angiotensin-Peptide dar. Hierbei wird deutlich, dass nicht die Länge des Peptids und die Anzahl der Peptidbindungen allein ausschlaggebend sind für die Verweildauer des Angiotensins auf der Säule und damit die Retentionszeit. Vielmehr scheint auch die absolute Anzahl, der Anteil und die Position der unpolaren, hydrophoben AS eine wichtige Rolle zu spielen. Hydrophobe AS sind Val, Tyr, Ile, Pro, Phe und Leu. Je mehr von diesen AS in einem Peptid enthalten sind, umso länger ist dessen Verweildauer auf der Säule.

Für die sichere Identifizierung der Angiotensine und ihrer Spaltprodukte sollten idealerweise mikromolare Testkonzentrationen vorliegen, wie T. Schäfer in seinen Versuchen zeigen konnte (Schäfer et al. 2001). Deshalb wurde für die Erstellung der Konzentrationskurven ein Konzentrationsbereich von 0-500 µM gewählt. Hier konnten die Ang-Peptide meist bis zu einer Konzentration von 10-25 µM nachgewiesen werden. Für die Abbau- und Inhibitionsversuche wurde eine Anfangskonzentration von 1 mM gewählt.

<u>Ret. zeit</u> <u>(min)</u>	Peptid	<u>Primärsequenz</u>	<u>Anteil</u> <u>hydrophobe AS</u>
8-8,5	Ang-(1-6)	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His	3/6 = 50%
11-12	Ang-(1-7)	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro	4/7 = 57%
11,5-12,5	Ang-(3-7)	Val-Tyr-Ile-His-Pro	4/5 = 80%
13,5-15,5	Ang-(5-8)	Ile-His-Pro-Phe	3/4 = 75%
15-16	Ang-(1-5)	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile	3/5 = 60%
18-20	Ang-(1-9)	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His	5/9 = 56%
25-27	Ang-(4-8)	Tyr-Ile-His-Pro-Phe	4/5 = 80%
26-28	Ang-(2-8)	Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	5/7 = 71%
28-32	Ang-(1-8)	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	5/8 = 63%
31-35	Ang-(2-10)	Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu	6/9 = 67%
34-36	Ang-(3-8)	Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe	5/6 = 83%
37-39	Ang-(1-10)	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu	6/10 = 60%

Tabelle 5: Retentionszeiten, Primärsequenz und Anteil hydrophober AS der untersuchten Ang-Peptide

Von den einzelnen Ang-Peptiden wurden Konzentrationsreihen in SD₆-Medium (500 µM, 250 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM) hergestellt und mittels HPLC untersucht. Die erste Spalte stellt die Retentionszeiten der Peptide dar, d.h. ihre Verweildauer auf der Säule. In der dritten Spalte sind die Primärsequenzen der Ang-Peptide dargestellt, wobei hydrophobe AS (Val, Tyr, Ile, Pro Phe, Leu) kursiv gedruckt sind. In der vierten Spalte ist der prozentuale Anteil an hydrophoben AS wiedergegeben.

4.1.3 Gleichzeitiger Lauf aller Angiotensin-Peptide

Nachdem jedes Ang-Peptid in der HPLC durch einen eigenen Peak dargestellt werden konnte, galt es zu untersuchen, ob mehrere in einer Probe enthaltene Ang-Peptide eindeutig aufgetrennt werden können. Dazu wurden alle zwölf oben genannten Ang-Peptide in verschiedenen Konzentrationen gemeinsam in einer Probe SD₆-Medium gelöst und

getestet. Anschließend wurden die HPLC-Laufzeiten variiert, bis es zu einer optimalen Auftrennung der einzelnen Peaks kam.

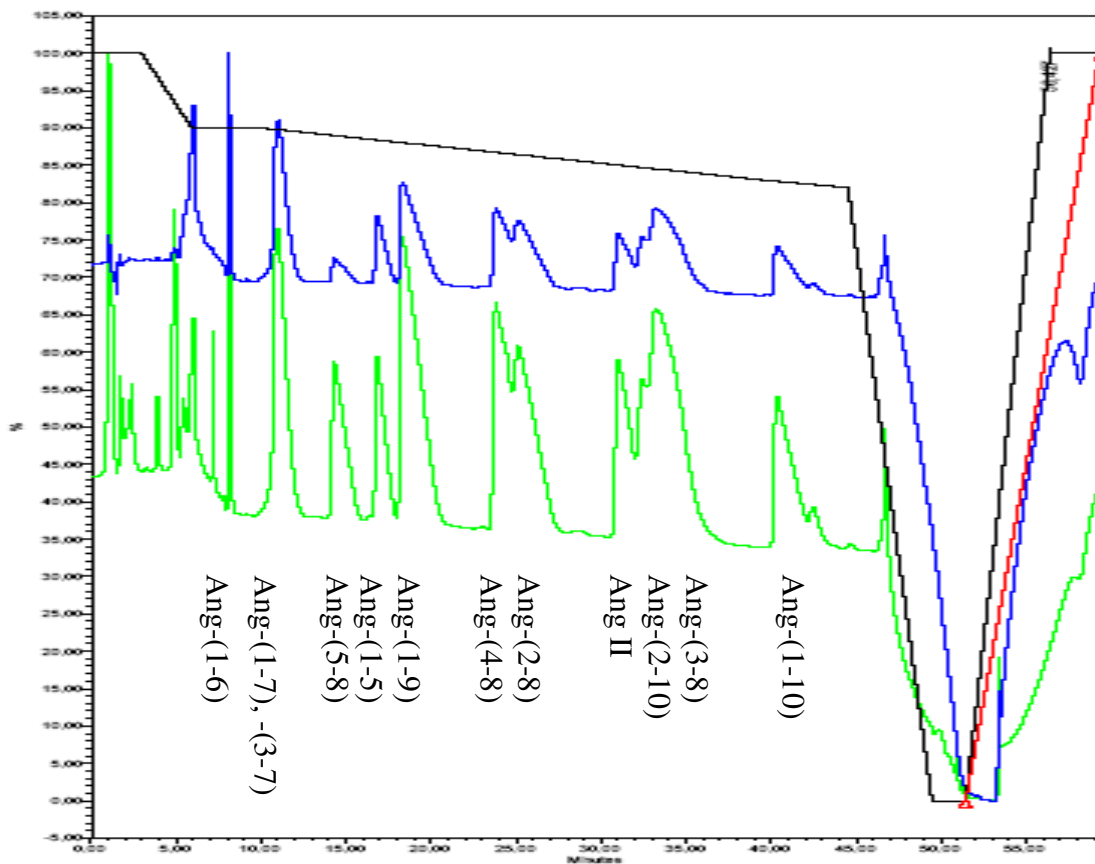
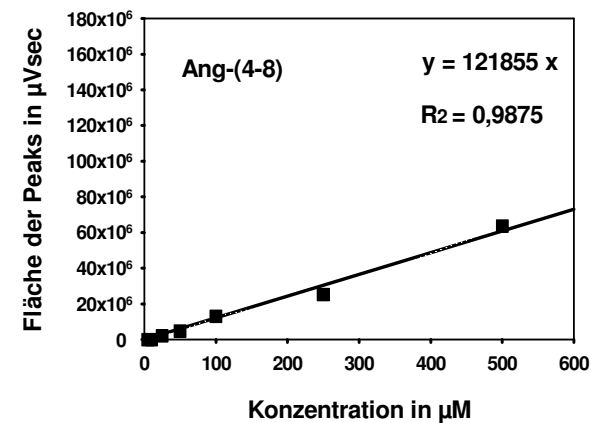
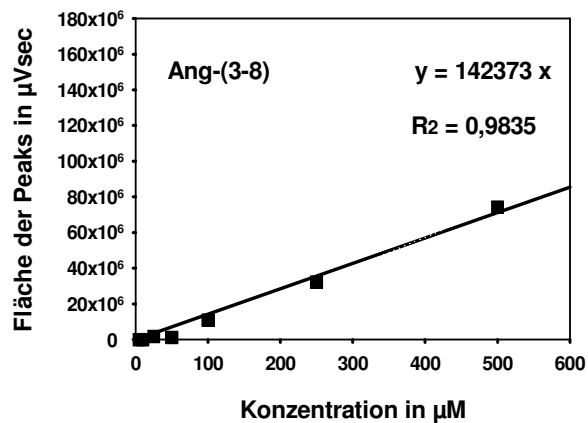
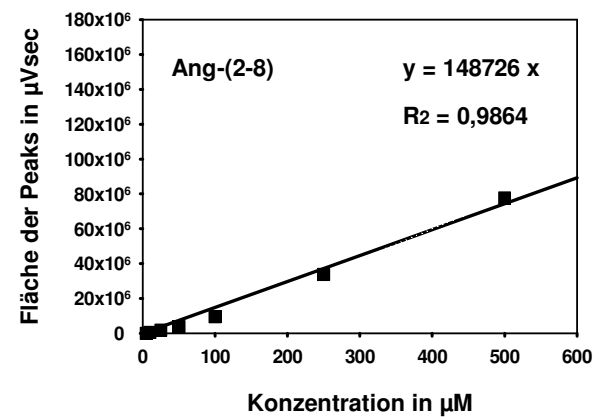
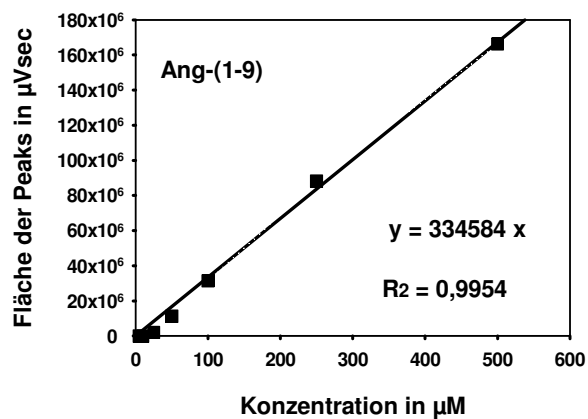
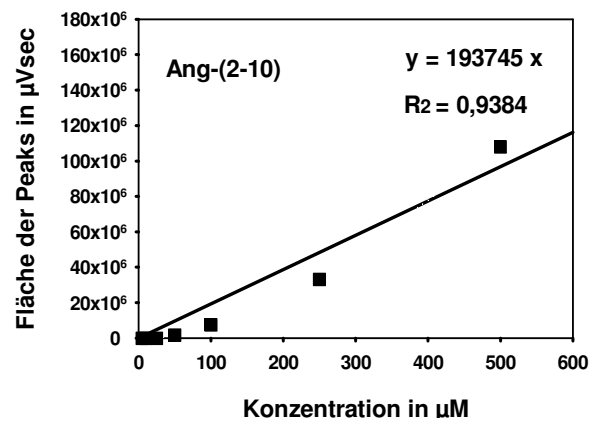
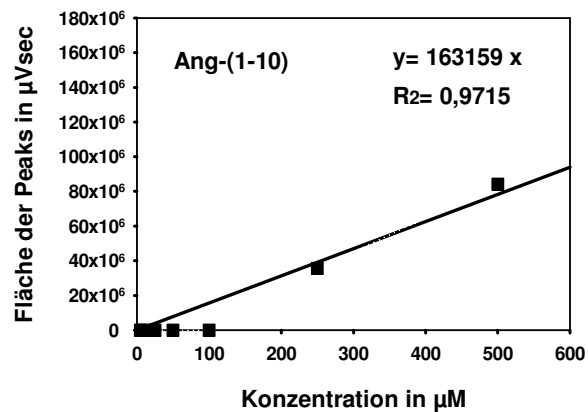


Abbildung 8: gemeinsames Auftreten aller Ang-Peptide in einem HPLC-Lauf

Es wurden je 500 μM aller zwölf untersuchten Ang-Peptide gemeinsam in einer Probe SD_6 -Medium gelöst. Die blaue Kurve entspricht der Absorptionswellenlänge 232 nm, die grüne Kurve 190 nm. Die schwarze Kurve stellt den Acetonitrilgradienten dar.

Die abgebildete HPLC-Kurve (Abbildung 8) verdeutlicht, dass eine Auftrennung der einzelnen Angiotensin-Peptide auch bei gleichzeitigem Vorhandensein in einer Probe meist gut möglich ist. Peptide, die aufgrund identischer Retentionszeiten nicht getrennt werden konnten, sind Ang-(1-7) und Ang-(3-7). Zu den Zeitpunkten 23 - 26 min und 30 - 36 min haben mehrere Ang-Peptide nahe beieinander liegende Retentionszeiten (siehe Tabelle 5), so dass es hier zu einem teilweisen Verschmelzen der Peaks kommt. Jedoch sind die einzelnen Peaks noch zu differenzieren. Die Tatsache, dass die einzelnen Peptide eindeutig aufgetrennt und bestimmt werden konnten, ist für die nachfolgenden Versuche von Bedeutung. Hier entstanden bei der Hydrolyse der Angiotensine teils mehrere neue Peptide, die es zu identifizieren galt.

4.1.4 Ermittlung der Ausgleichsgeraden und deren Steigung



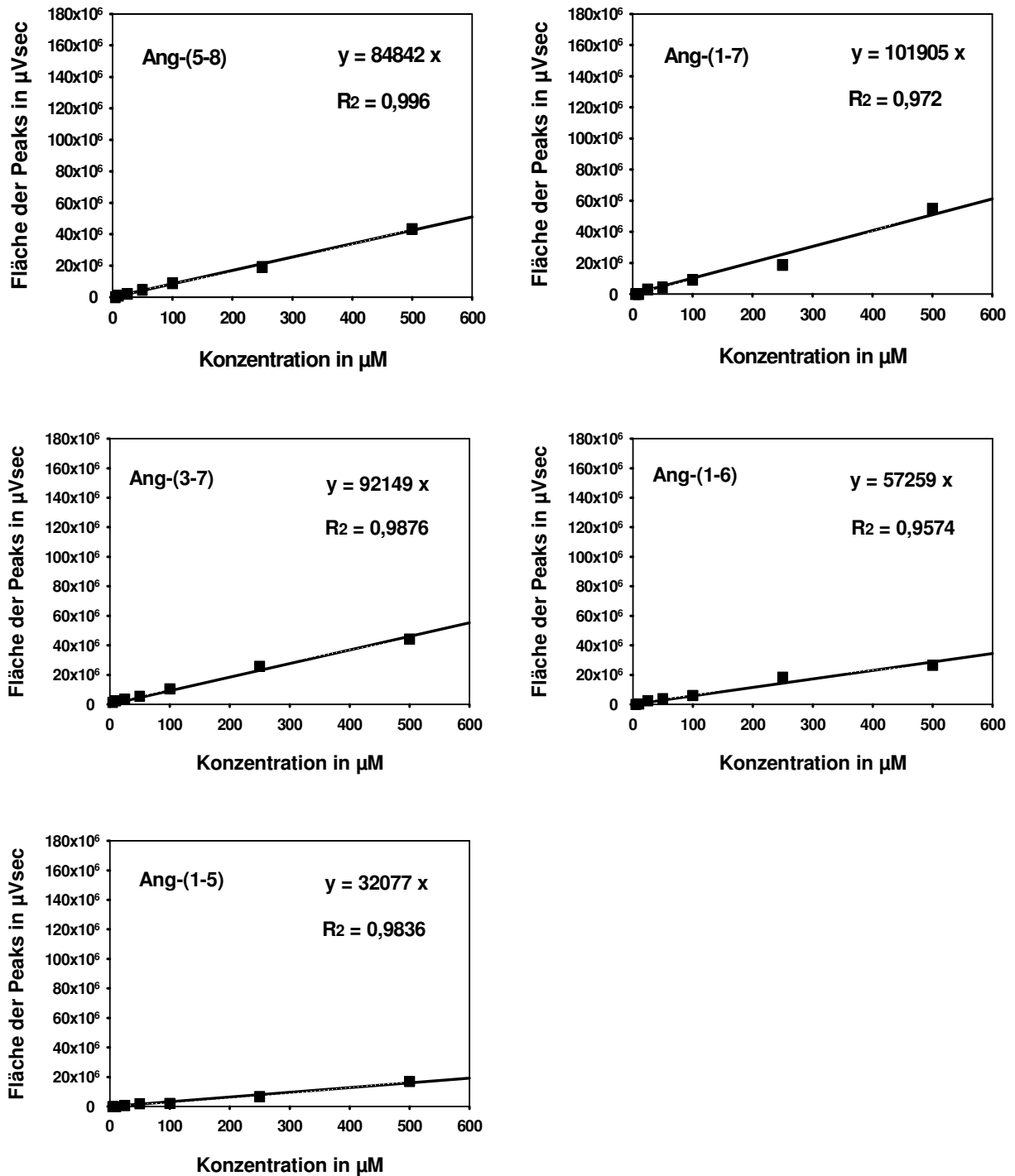


Abbildung 9: Ausgleichsgeraden der einzelnen Ang-Peptide

Von den einzelnen Ang-Peptiden wurden Konzentrationsreihen in SD₆-Medium (500 µM, 250 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM) hergestellt und in der HPLC untersucht.

Um die gewonnenen Werte in die einfacher zu handhabende Einheit µM umrechnen und einzelne Ang-Peptide dadurch miteinander vergleichen zu können, wurden die Konzentrationsreihen graphisch aufgetragen, eine Ausgleichsgerade gelegt und die

Rohwerte durch deren Steigung geteilt. Nachdem die Steigung und die Standardabweichung R^2 jeder Ausgleichsgeraden berechnet war, wurde der Rohwert einer jeden 500 μM -Messung durch den Wert der jeweiligen Steigung geteilt, um die Genauigkeit der Methode beurteilen zu können. Es wurden Werte zwischen 461 μM und 557 μM ermittelt. Die maximale Abweichung der errechneten μM zu den eingesetzten μM betrug 11,4 %, die durchschnittliche Abweichung 5,2 %. Die ermittelten Steigungswerte wurden in sämtlichen nachfolgenden Versuchen verwendet, um die Rohdaten der identifizierbaren Ang-Peptide in μM umzurechnen.

<u>Ang-Peptid</u>	<u>Steigung der Ausgleichsgeraden ($\mu\text{Vsec}/\mu\text{M}$)</u>	<u>R^2</u>	<u>Errechnete Konzentration (eingesetzt 500 μM)</u>
Ang-(1-10)	163159	0,9715	516 μM
Ang-(2-10)	193745	0,9384	557 μM
Ang-(1-9)	334584	0,9954	497 μM
Ang-(2-8)	148726	0,9864	522 μM
Ang-(3-8)	142373	0,9835	522 μM
Ang-(4-8)	121855	0,9875	522 μM
Ang-(5-8)	84842	0,996	511 μM
Ang-(1-7)	101905	0,972	537 μM
Ang-(3-7)	92149	0,9876	480 μM
Ang-(1-6)	57259	0,9574	461 μM
Ang-(1-5)	32077	0,9836	526 μM

Tabelle 6: Steigungsgeraden mit Standardabweichungen der einzelnen Ang-Peptide, sowie errechnete Konzentration in μM der 500 μM -Werte

4.2 Abbaukinetiken

Nachdem die Bedingungen für die Darstellung der einzelnen Angiotensine mittels HPLC optimiert worden waren und für jedes Angiotensin die individuelle Retentionszeit und der dazugehörige Peak identifiziert werden konnten, wurde mit der Untersuchung der Abbaukinetiken im Vergleich Präadipocyten – Adipocyten begonnen. Untersucht wurden AGT und die Ang-Peptide (1-14), (1-13), (1-10), (2-10), (1-9), (2-8), (3-8), (4-8), (5-8), (1-7), (3-7), (1-6), (1-5) und damit sowohl vollständige, biologisch aktive Angiotensine, als auch einzelne Peptidfragmente. Dazu wurden PA und A verschiedener Populationen

jeweils 1 mM eines Ang-Peptides zugegeben und zu vorher festgelegten Zeitpunkten Proben der Überstände entnommen. Somit konnte der Ablauf der Hydrolyse und die Entstehung neuer Peptidfragmente beobachtet werden. Die eingesetzten PA- und A-Populationen unterschieden sich nicht wesentlich hinsichtlich ihrer Zelldichte (siehe jeweils Abbildung B, Proteinkonzentration) jedoch deutlich hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades (siehe jeweils Abbildung B, spezifische GPDH-Aktivität)

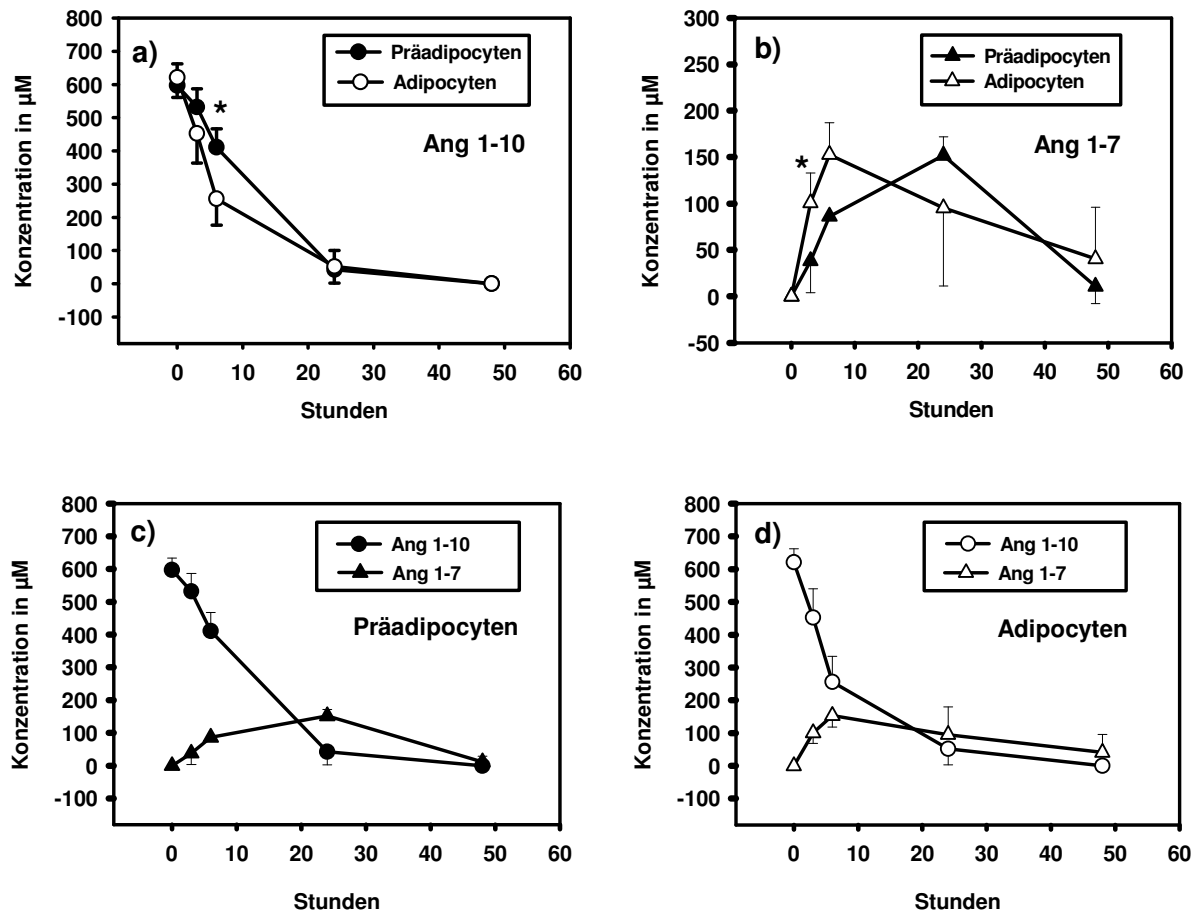
4.2.1 AGT, Ang-(1-14), Ang-(1-13)

Der Nachweis von AGT und des längeren Ang-Peptids Ang-(1-14) mittels HPLC gelang nicht. Auch konnten nach Zugabe dieser Peptide zu den PA und A im Verlauf keine weiteren entstehenden kürzeren Ang-Peptide nachgewiesen werden. Lediglich Ang-(1-13) stellte sich als Peak mit einer Retentionszeit von 41 min dar, allerdings ebenfalls ohne nachweisbare Spaltprodukte während seiner deutlich ablaufenden Hydrolyse (nicht graphisch dargestellt). Für die Halbwertszeiten (HWZ) von Ang-(1-13) siehe Tabelle 7.

4.2.2 Ang-(1-10)

Die PA bauten Ang-(1-10) in den ersten 6 Stunden deutlich langsamer ab als die A (Abbildung 10). Nach 3 Stunden wurden erst 11 % und nach 6 Stunden 32 % der Ausgangskonzentration von den PA hydrolysiert. Im Gegensatz dazu konnten die A nach 3 Stunden bereits 27 % und nach 6 Stunden 59 % des Ang-(1-10) abbauen. Nach 24 Stunden hatten sowohl PA als auch A über 90 % des zugegebenen Peptids eliminiert und nach 48 Stunden konnte das Peptid nicht mehr nachgewiesen werden. Für die HWZ siehe Tabelle 7. Als Produkte des Ang-(1-10)-Abbaus konnten Ang-(1-7) und Ang-(2-10) identifiziert werden, wobei Ang-(1-7) das Hauptprodukt bildete. Korrelierend mit der rascheren Hydrolyse des Ursprungspeptids durch die A erreichte auch die Neusynthese von Ang-(1-7) ihr Maximum bereits nach 6 Stunden, während die PA hierfür 24 Stunden benötigten. Nach 3 Stunden entsprach die Menge an neu entstandenem Ang-(1-7) 16 % der Menge an Ang-(1-10) zum Zeitpunkt 0 Stunden. Die PA bildeten im selben Zeitraum mit 7 % nur knapp die Hälfte an Ang-(1-7). Nach 6 Stunden erreichte die Neubildung des Peptids durch die A mit 25 % des Ausgangswertes von Ang-(1-10) ihren Maximalwert. Bei den PA betrug die maximal gebildete Konzentration an Ang-(1-7) ebenfalls 25 % des Ang-(1-10), allerdings erst nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden war das neu entstandene Peptid sowohl bei A als auch bei PA fast vollständig wieder abgebaut.

A)



B)

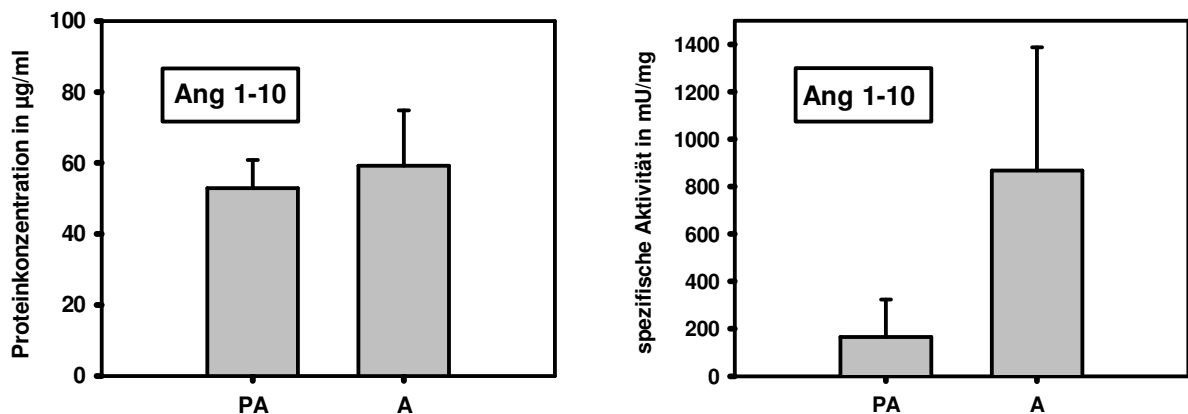


Abbildung 10: Ang-(1-10) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von Ang-(1-10) und der Neusynthese von Ang-(1-7) im Vergleich PA und A. a) Hydrolyse von Ang-(1-10); b) Synthese von Ang-(1-7); c), d) gemeinsame Darstellung von Hydrolyse und Neusynthese.

B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

* :signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n=6$

Ang-(2-10) entstand beim Abbau von Ang-(1-10) in deutlich geringerem Ausmaß als Ang-(1-7) und wurde auch schneller wieder hydrolysiert (aufgrund der geringen Menge nicht graphisch dargestellt). Es bestand jedoch ein Unterschied zwischen PA und A. Während bei allen untersuchten PA-Populationen nach 3 und 6 Stunden geringe Mengen an Ang-(2-10) nachgewiesen werden konnten, war das Peptid lediglich bei einer der untersuchten A-Populationen detektierbar.

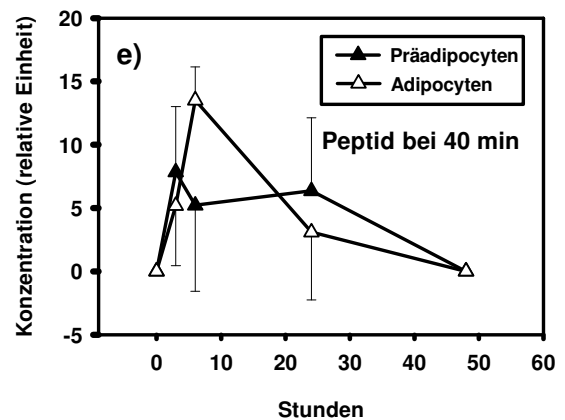
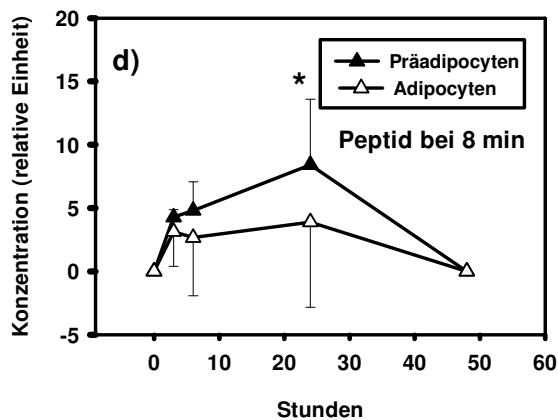
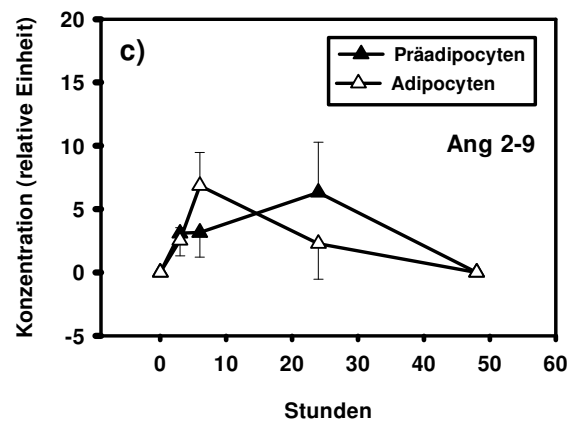
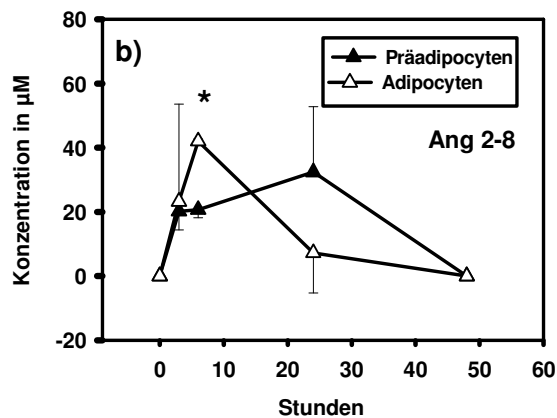
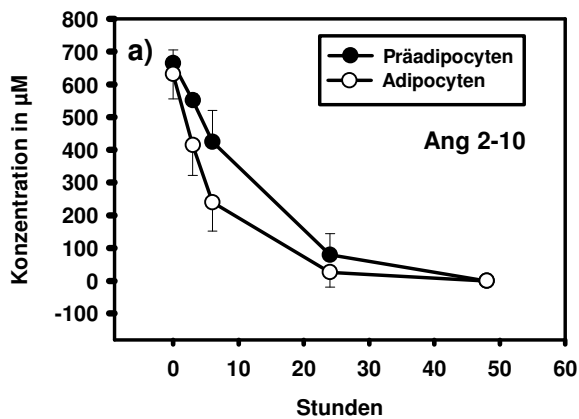
4.2.3 Ang-(2-10)

Der Abbau von Ang-(2-10) verlief durch die A schneller (siehe Abbildung 11). Diese bauten in den ersten 3 Stunden 34 % des zugegebenen Peptids ab und in den darauffolgenden 3 Stunden weitere 20 %. Die PA erreichten dagegen erst nach 6 Stunden einen Abbau von 35 %. Nach 24 Stunden hatten die A über 90 % und die PA knapp 80 % an Ang-(2-10) eliminiert. Nach 48 Stunden konnte Ang-(2-10) bei beiden Zelltypen nicht mehr nachgewiesen werden. Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant, da die Abbaugeschwindigkeiten der untersuchten A-Populationen zu den jeweiligen Zeitpunkten sehr voneinander abwichen. Für die HWZ siehe Tabelle 7.

Während des Abbaus von Ang-(2-10) entstanden vier kürzere Fragmente, die per HPLC detektiert wurden. Ang-(2-8) ist davon das einzige Abbau-Produkt, das eindeutig identifiziert werden konnte. Es erschien erstmals nach 3 Stunden und wurde zu diesem Zeitpunkt von PA und A etwa in der gleichen Menge gebildet. Die Menge an Ang-(2-8) stieg bei den PA nach 24 Stunden nur unwesentlich an und wurde anschließend schnell wieder abgebaut. Die A dagegen verdoppelten die Menge des von ihnen gebildeten Ang-(2-8) bis zum Zeitpunkt 6 Stunden. Nach 24 Stunden wurde nur noch eine geringe Menge des Peptids gefunden. Ebenfalls nach 3 Stunden zeigte sich ein weiterer Peak mit einer Retentionszeit von 17 - 18 min. Diese Retentionszeit entspricht der des Ang-(1-9), so dass die Vermutung nahe liegt, bei dem neu entstandenen Peptid könnte es sich um Ang-(2-9) handeln. Eine eindeutige Identifizierung war jedoch nicht möglich, da das Peptid Ang-(2-9) in käuflicher Form nicht zur Verfügung stand und so dessen Retentionszeit nicht bestimmt und keine Eichgerade erstellt werden konnte. Nach 3 Stunden bildeten PA und A etwa gleiche Mengen des Peptids, die PA verdoppelten diesen Wert nach 24 Stunden, bei den A stieg er nach 6 Stunden bereits auf das dreifache an. Anschließend wurde auch dieses Peptid wieder hydrolysiert. Zwei weitere neue Peaks wurden jeweils nach einer Retentionszeit von 8 und 40 min detektiert. Der Peak bei 40 min erreichte bei den A sein Maximum nach 6 Stunden, bei den PA nach 24 Stunden. Das

Peptid mit 8 min Retentionszeit erreichte sein Maximum sowohl bei den PA als auch bei den A erst nach 24 Stunden, zu einem Zeitpunkt als die meisten anderen Peptide sich bereits wieder im Abbau befanden. Die von den PA gebildete Menge war etwa doppelt so hoch wie die der A.

A)



B)

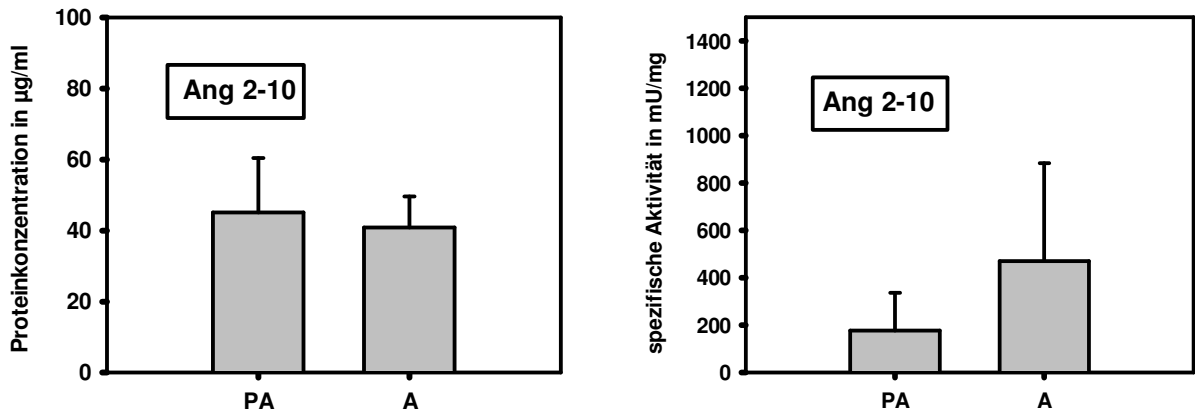


Abbildung 11: Ang-(2-10) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von Ang-(2-10) und der Neusynthese der Spaltprodukte im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben. a) Hydrolyse von Ang-(2-10); b) Synthese von Ang-(2-8); c) Synthese eines Peptids mit der Retentionszeit 17 min; d) Synthese eines Peptids mit der Retentionszeit 40 min; e) Synthese eines Peptids mit der Retentionszeit 8 min.

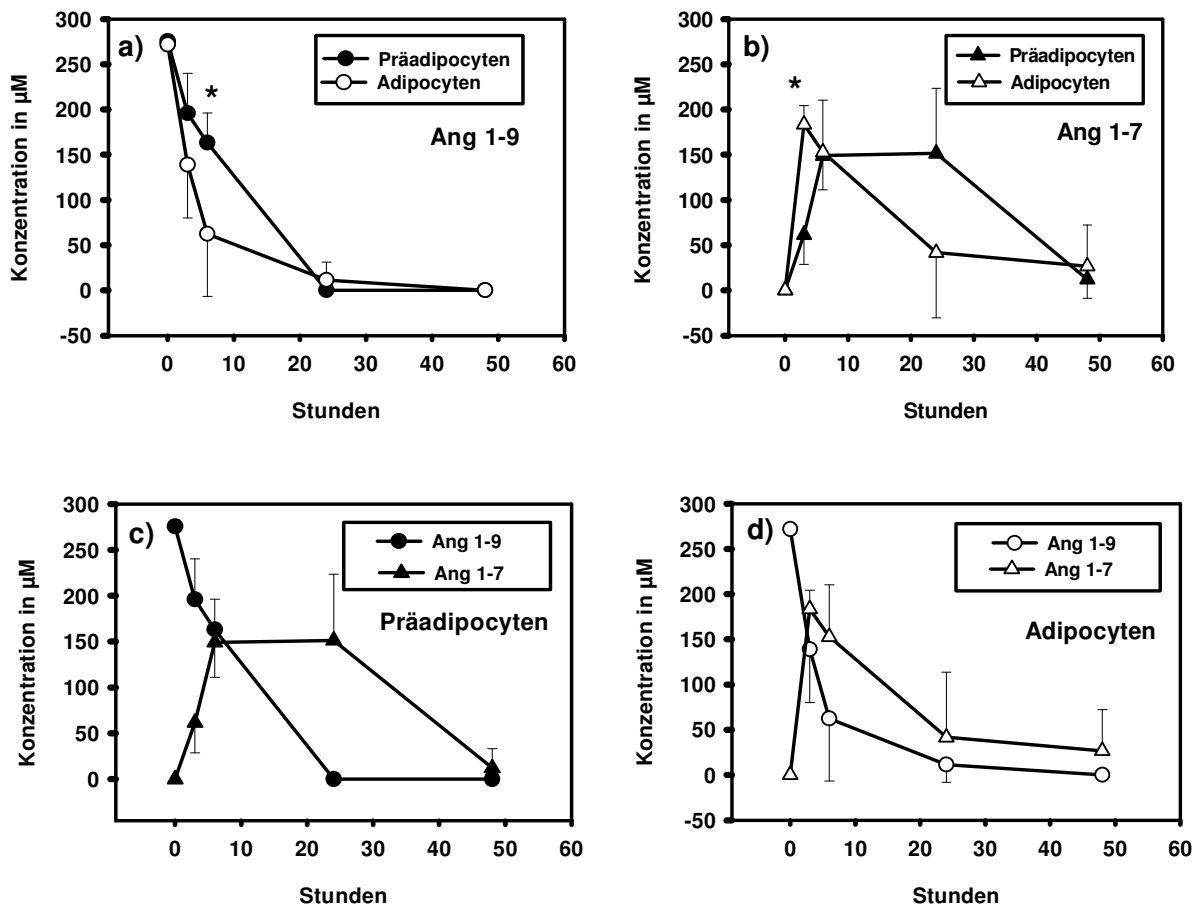
B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n=6$

4.2.4 Ang-(1-9)

Die PA setzten Ang-(1-9) in den ersten Stunden langsamer um als die A (siehe Abbildung 12). So war die Ang-(1-9)-Konzentration bei den PA nach 3 Stunden auf 71 % und nach 6 Stunden auf 59 % des Ausgangswertes gefallen, während die A im selben Zeitraum bereits knapp die Hälfte bzw. Dreiviertel des zugegebenen Peptids abgebaut hatten. Zum Zeitpunkt 24 Stunden war das Peptid durch alle Populationen vollständig abgebaut worden. Zu den HWZ siehe Tabelle 7. Ang-(1-7) war das einzige detektierbare Abbauprodukt von Ang-(1-9). Es wurde von den A schneller und in größerer Menge gebildet und schneller wieder umgesetzt als von den PA. Nach 3 Stunden erreichten die A mit 68 % des Ausgangswertes an Ang-(1-9) bereits ihren Maximalwert. Die PA dagegen bildeten nach 3 Stunden erst ein Drittel der Menge an Ang-(1-7) im Vergleich zu den A. Die scheinbare Stagnation der Neubildung von Ang-(1-7) zwischen 6 und 24 Stunden kam hier durch den unterschiedlichen Zeitpunkt zustande, zu dem die drei PA-Populationen ihren jeweiligen Maximalwert an Ang-(1-7) bildeten. Da zudem eine der drei A-Populationen das entstandene Ang-(1-7) langsamer als die anderen beiden Präparationen hydrolysierte, ist der Unterschied bei 6 und 24 Stunden nicht signifikant.

A)



B)

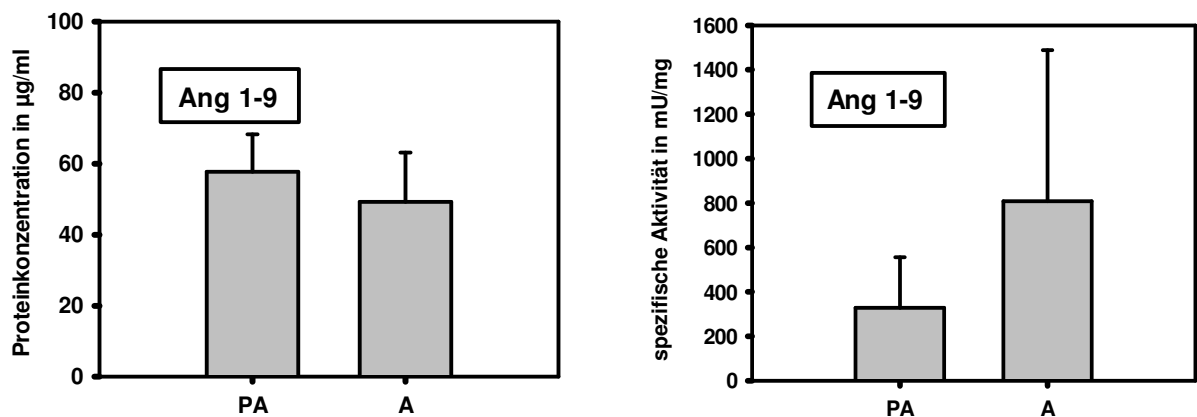


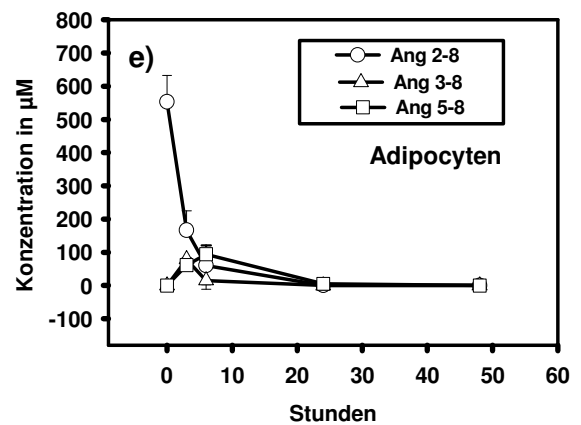
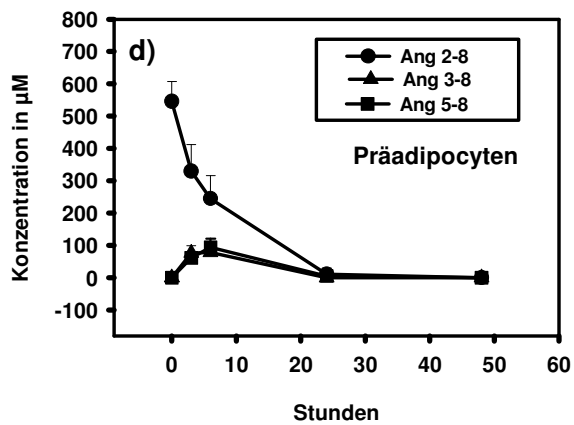
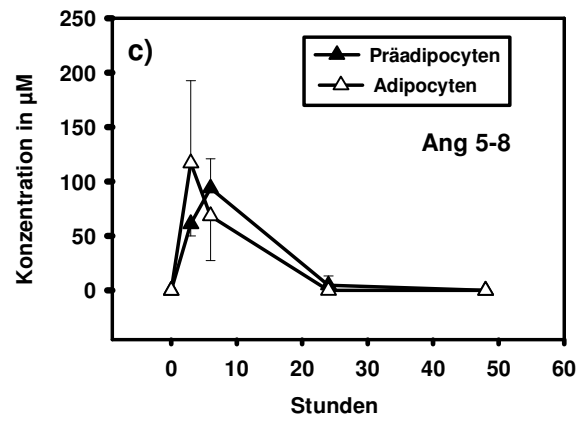
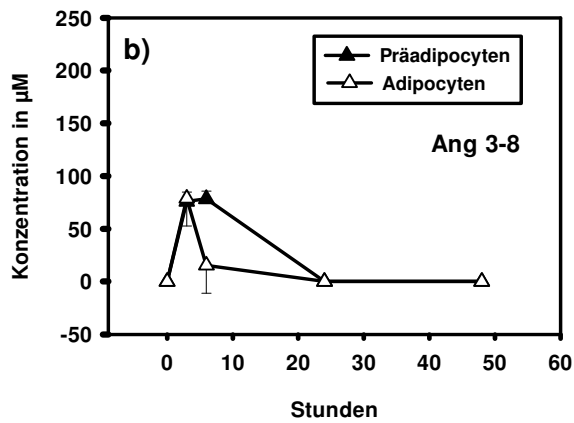
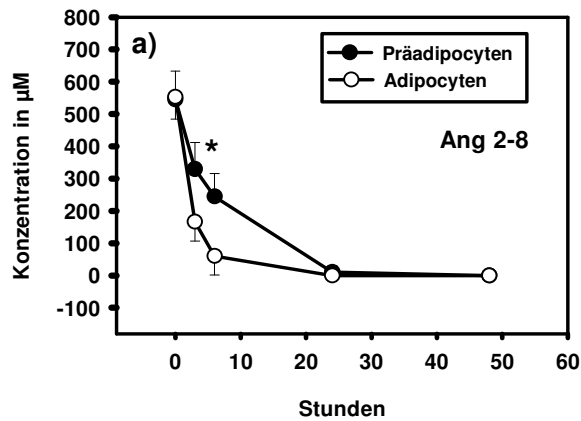
Abbildung 12: Ang-(1-9) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von Ang-(1-9) und der Neusynthese von Ang-(1-7) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben. a) Hydrolyse von Ang-(1-10); b) Synthese von Ang-(1-7); c), d) gemeinsame Darstellung von Hydrolyse und Neusynthese.

B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n = 3$

4.2.5 Ang-(2-8)



B)

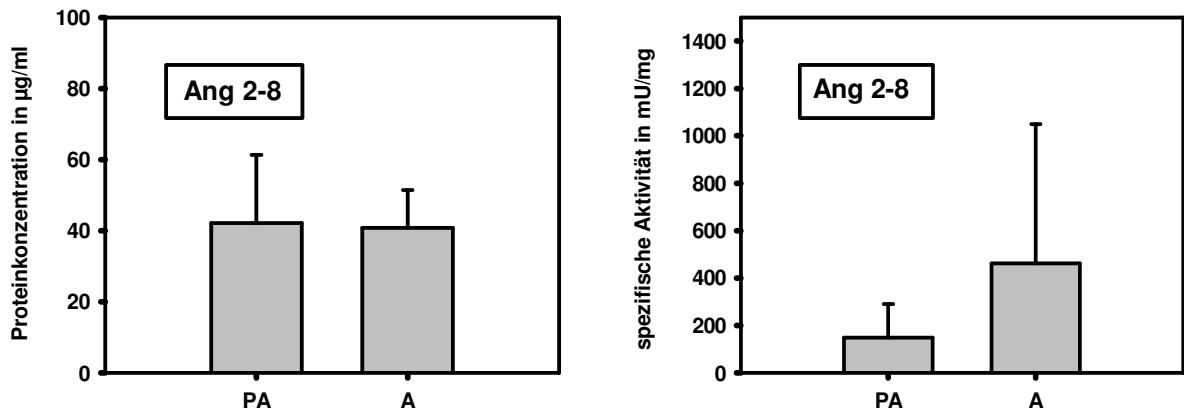


Abbildung 13: Ang-(2-8) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von Ang-(2-8) und der Neusynthese von Ang-(3-8) und Ang-(5-8) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben. a) Hydrolyse von Ang-(2-8); b) Synthese von Ang-(3-8); c) Synthese von Ang-(5-8); d) e) gemeinsame Darstellung von Hydrolyse und Neusynthese.

B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n=8$

Die Hydrolyse von Ang-(2-8) erfolgte sowohl durch PA als auch durch A sehr rasch. In den ersten 3 Stunden bauten die A 70 % des Peptids ab und damit etwa doppelt soviel wie die PA im selben Zeitraum. Nach 6 Stunden waren noch 10 % des Peptids bei den A und 45 % bei den PA vorhanden. Nach 24 Stunden war Ang-(2-8) bei fast allen untersuchten Präparationen vollständig hydrolysiert.

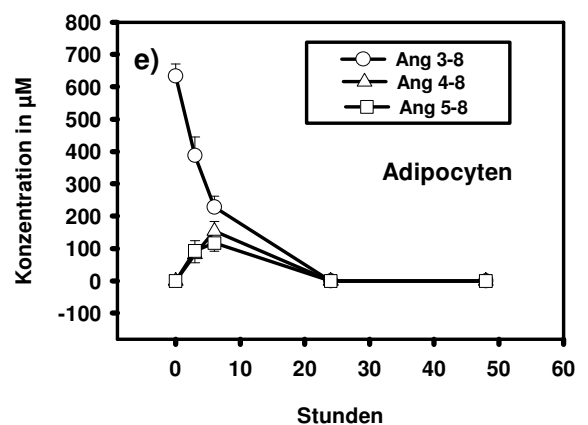
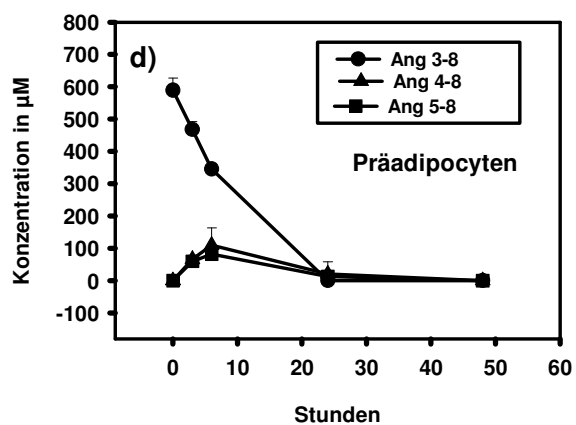
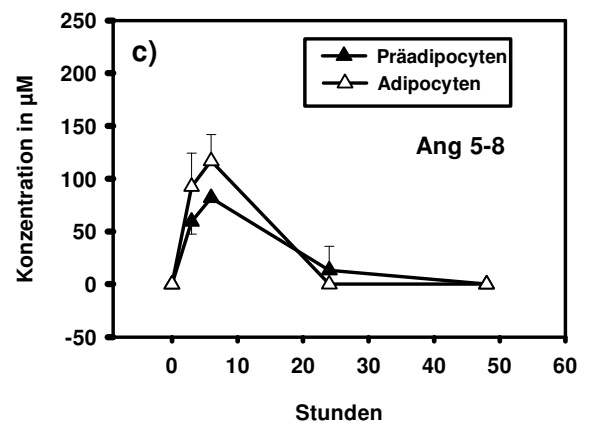
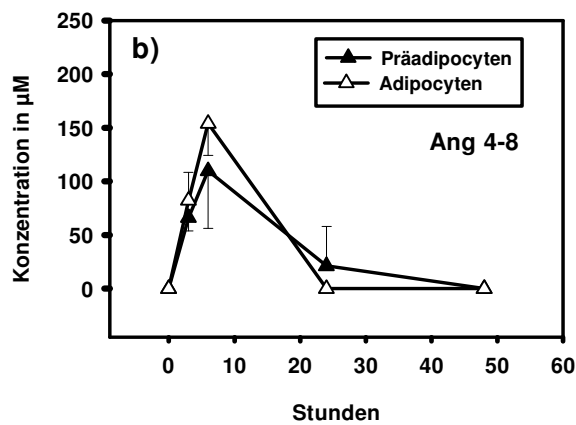
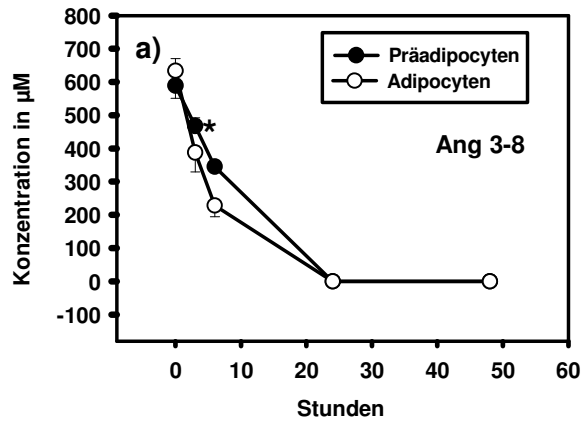
Bereits nach 3 Stunden zeigten sich zwei neue Peaks, die als Ang-(3-8) und Ang-(5-8) identifiziert werden konnten. Nach 3 Stunden hatten PA und A ihren Maximalwert an Ang-(3-8) gebildet. Die A bauten das Peptid gleich darauf schnell wieder ab, während der Abbau bei den PA erst nach 6 Stunden deutlich wurde. Ang-(5-8) erreichte bei den A ebenfalls nach 3 Stunden seinen höchsten Wert und wurde daraufhin wieder hydrolysiert. Die PA bildeten erst nach 6 Stunden ihren Maximalwert, der etwas unter dem der A lag.

4.2.6 Ang-(3-8)

Ang-(3-8) wurde von den A deutlich schneller als von den PA umgesetzt (siehe Abbildung 14). Nach 3 Stunden waren bereits knapp 40 % und nach 6 Stunden 65 % der zugegebenen Peptid-Menge abgebaut worden. Die PA hatten nach 3 Stunden 20 % und nach 6 Stunden 40 % des Ang-(3-8) hydrolysiert. Nach 24 Stunden war das Peptid sowohl

durch die A als auch durch die PA vollständig abgebaut worden. Für die HWZ siehe Tabelle 7.

A)



B)

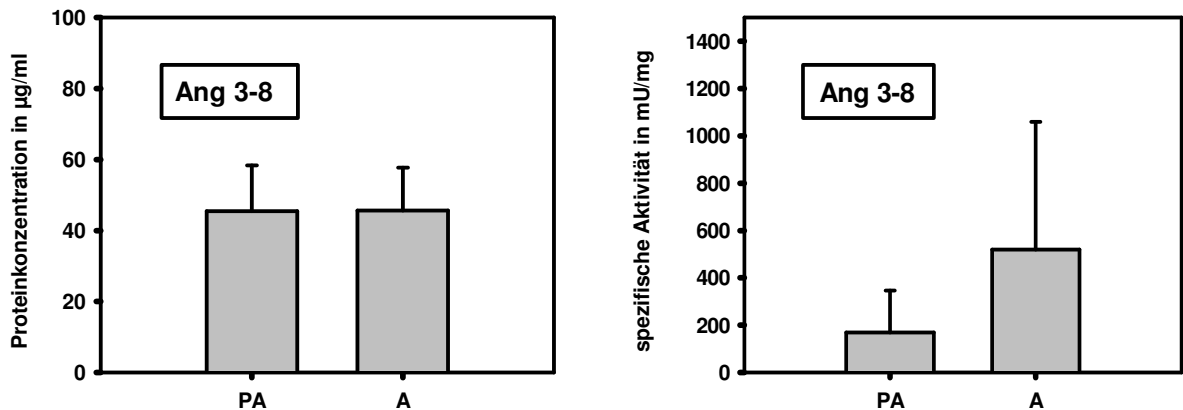


Abbildung 14: Ang-(3-8) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von Ang-(3-8) und der Neusynthese von Ang-(4-8) und Ang-(5-8) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben. a) Hydrolyse von Ang-(3-8); b) Synthese von Ang-(4-8); c) Synthese von Ang-(5-8); d) e) gemeinsame Darstellung von Hydrolyse und Neusynthese.

B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n=9$

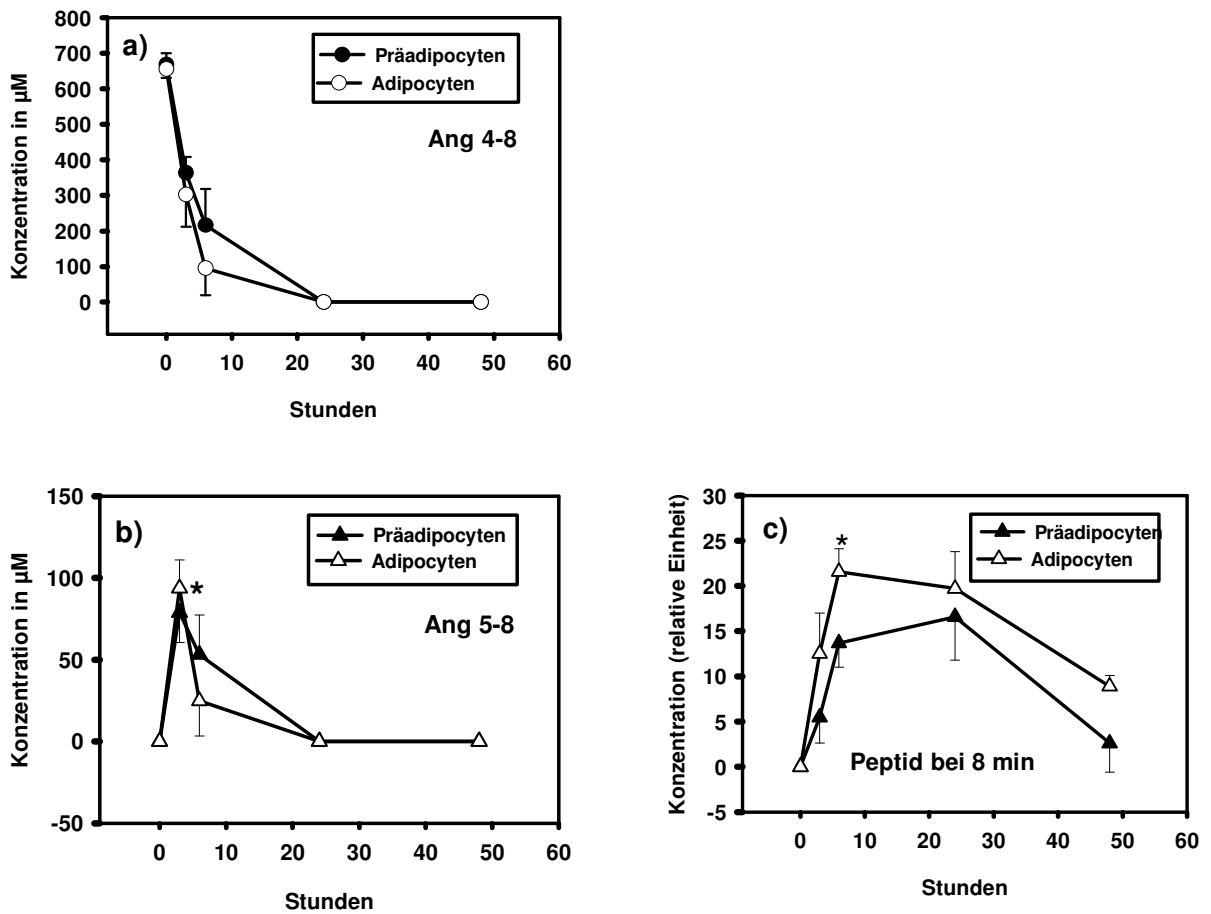
Nach 3 Stunden waren zwei neue Peaks entstanden, die als die Fragmente Ang-(4-8) und Ang-(5-8) identifiziert werden konnten. Die Entstehung und Hydrolyse beider Peptide zeigte bei PA und bei A einen ähnlichen Verlauf. Der Maximalwert wurde jeweils nach 6 Stunden erreicht, anschließend kam es zur raschen Hydrolyse der neu entstandenen Peptide. Die A bildeten zu den gemessenen Zeitpunkten größere Mengen an Ang-(4-8) und Ang-(5-8) als die PA. Allerdings sind diese Unterschiede nicht signifikant.

4.2.7 Ang-(4-8)

PA und A bauten Ang-(4-8) relativ zügig ab (siehe Abbildung 15). Nach 6 Stunden hatten die PA zwei Drittel des zugegebenen Peptids und die A 84 % abgebaut. Nach 24 Stunden konnte das Angiotensin nicht mehr nachgewiesen werden. Für die HWZ siehe Tabelle 7.

Beim Abbau von Ang-(4-8) entstanden das Ang-Fragment (5-8) und ein Peptid mit 8 min Retentionszeit, das nicht identifiziert werden konnte. Korrelierend mit der raschen Hydrolyse des ursprünglichen Angiotensins erreichte das neugebildete Ang-(5-8) sein Maximum bei beiden Zelltypen bereits nach 3 Stunden. Entsprechend der kurzen HWZ von Ang-(5-8) (siehe Tabelle 7) wurde es selbst auch schnell wieder abgebaut. Diese Hydrolyse erfolgte bei den A signifikant schneller als bei den PA.

A)



B)

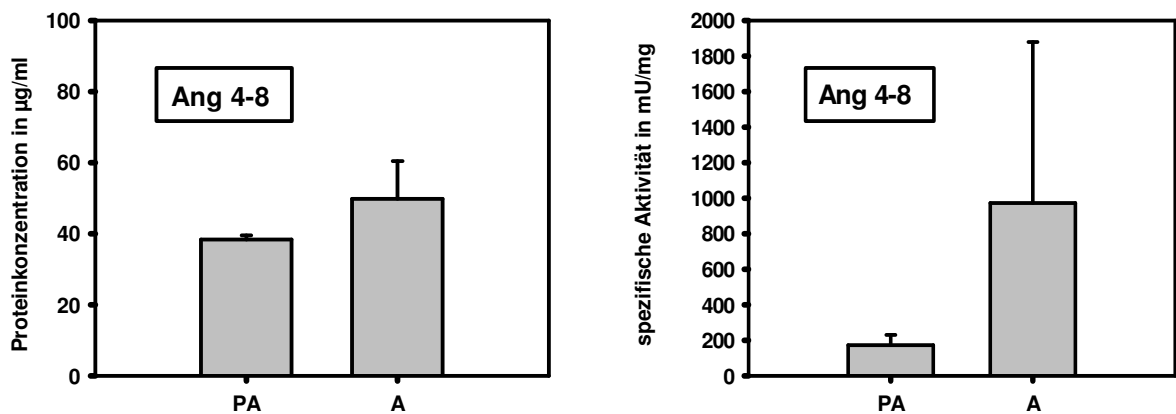


Abbildung 15: Ang-(4-8) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von Ang-(4-8) und der Neusynthese der Spaltprodukte im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben. a) Hydrolyse von Ang-(4-8); b) Synthese von Ang-(5-8); c) Synthese eines nicht identifizierten Spaltproduktes mit der Retentionszeit von 8 min.

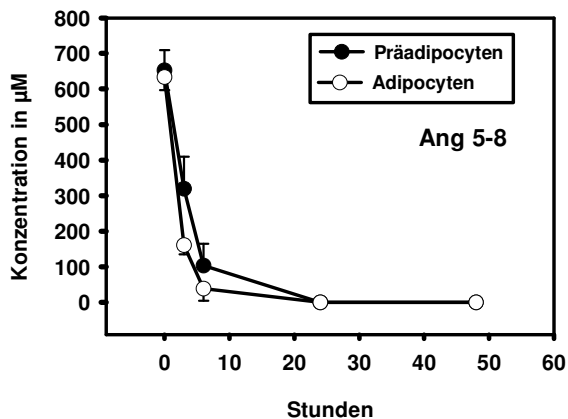
B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n = 3$

Ebenfalls nach 3 Stunden trat erstmals ein neuer Peak mit einer Retentionszeit von 8 min auf, der seinen höchsten Wert nach 6 Stunden (A), bzw. 24 Stunden (PA) erreichte. Zu jedem Zeitpunkt bildeten die A eine größere Menge dieses Peptid-Fragmentes. Der maximal von den PA erreichte Wert betrug etwa 75 % des Maximums der A.

4.2.8 Ang-(5-8)

A)



B)

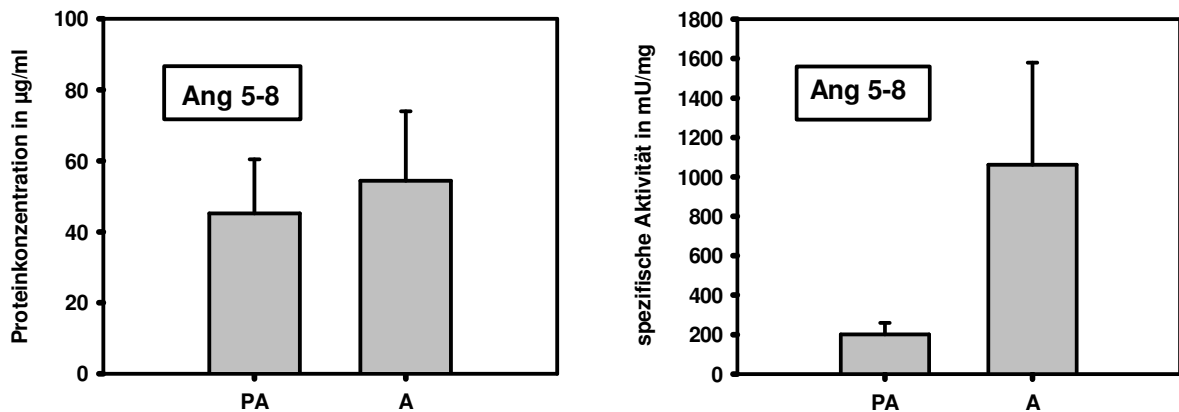


Abbildung 16: Ang-(5-8) - Abbaukinetik, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von Ang-(5-8) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben. a) Hydrolyse von Ang-(4-8); b) Synthese von Ang-(5-8); c) Synthese eines nicht identifizierten Spaltproduktes mit der Retentionszeit von 8 min.

B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

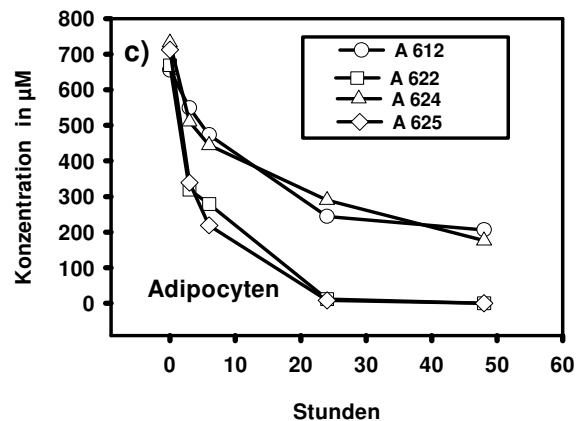
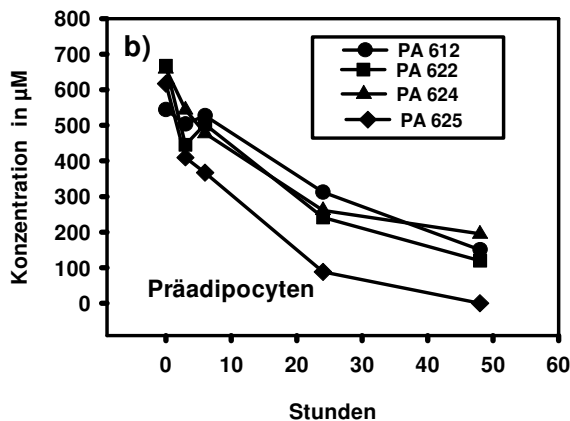
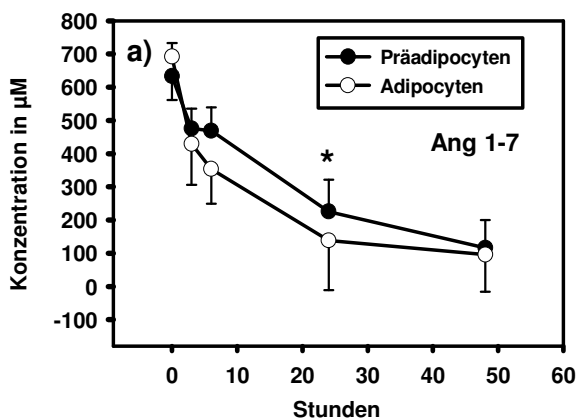
* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n=3$

Das Peptidfragment Ang-(5-8) hat nur eine sehr kurze HWZ (siehe Tabelle 7). Nach 3 Stunden hatten die A bereits 75 % des zugegebenen Peptids eliminiert. Nach 6 Stunden konnten noch 6 % (A), bzw. 16 % (PA) des Ang-(5-8) nachgewiesen werden. Es wurden keine Abbauprodukte detektiert.

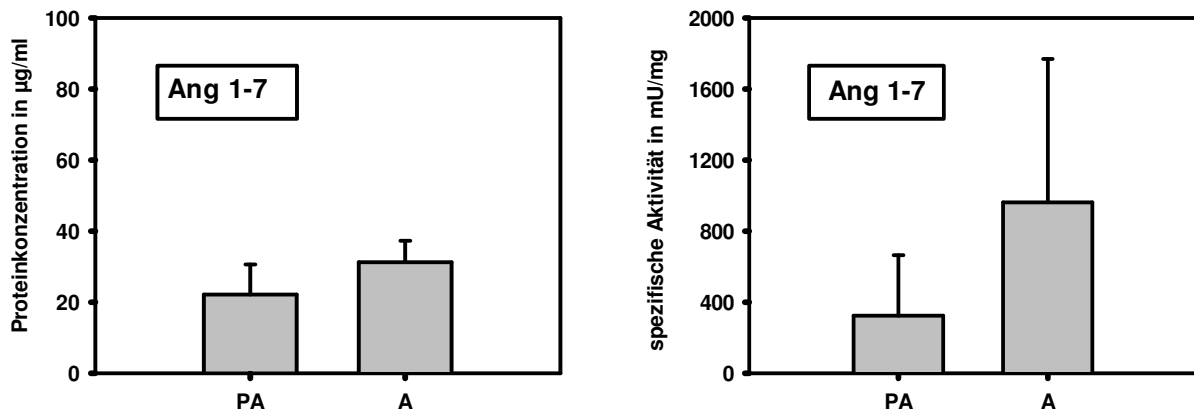
4.2.9 Ang-(1-7)

Der Verlauf der Hydrolyse von Ang-(1-7) durch PA und A erwies sich als sehr inhomogen (siehe Abbildung 17). Während drei der vier untersuchten PA-Populationen das zugegebene Peptid relativ einheitlich hydrolysierten, zeigte eine Population einen deutlich schnelleren Abbau. Diese Population hatte nach 6 Stunden bereits 40 % und nach 48 Stunden das gesamte zugegebene Peptid eliminiert, während im Überstand der übrigen Populationen am Ende der Versuchsreihe immer noch 20 - 30 % des Ang-(1-7) nachgewiesen werden konnten. Für die HWZ siehe Tabelle 7.

A)



B)



C)

Population	Proteinkonzentration in µg/ml	Spezifische Aktivität in mU/mg
PA 612	25,48	23,8
PA 622	11,24	810,4
PA 624	31,20	195,3
PA 625	20,82	269,0
A 612	31,34	70,2
A 622	22,56	1465,9
A 624	34,96	515,4
A 625	35,98	1800,4

Abbildung 17: Ang-(1-7) - Abbaukinetik, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von Ang-(1-7) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben. a) Hydrolyse von Ang-(1-7); b) c) Einzeldarstellung der Hydrolyse durch alle vier PA- und A-Populationen c) Synthese eines nicht identifizierten Spaltproduktes mit der Retentionszeit von 8 min.

B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

C: Tabellarische Darstellung der Proteinkonzentration und spezifischen GPDH-Aktivität der in den Versuchen zur Abbaukinetik von Ang-(1-7) verwendeten PA- und A-Populationen.

* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n=4$

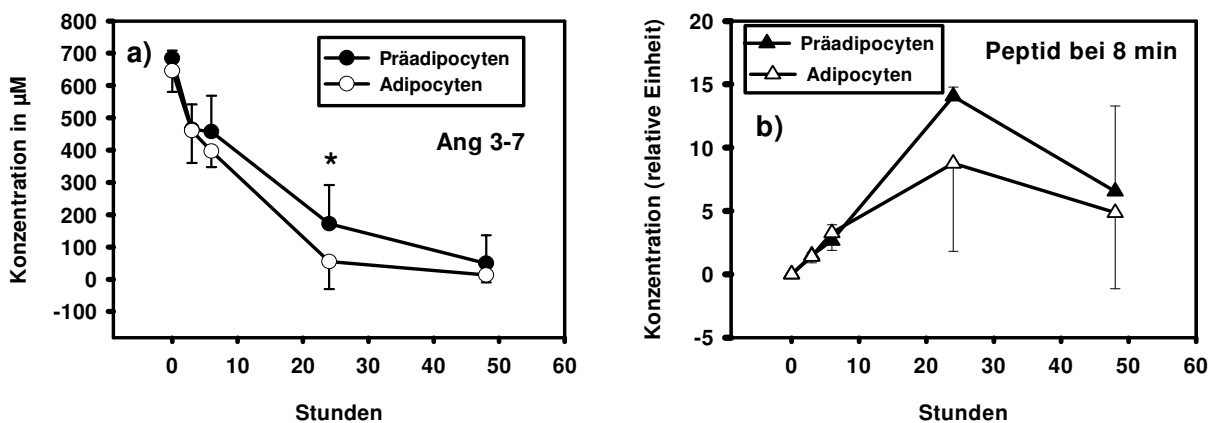
Noch deutlicher war der Unterschied im Hydrolyseverhalten bei den untersuchten A. Hier zeigten zwei der vier untersuchten Populationen eine langsame Elimination von Ang-(1-7), die ähnlich der der PA verlief, mit einer HWZ von 17 Stunden. Die anderen beiden Kulturen bauten das Peptid deutlich schneller ab mit einer HWZ von nur 3 Stunden. Nach 24 Stunden war Ang-(1-7) hier praktisch vollständig verschwunden. Diese Unterschiede

korrelierten deutlich mit dem Differenzierungsgrad der einzelnen A-Populationen (siehe Abbildung 17 C): Die beiden Populationen, die Ang-(1-7) langsamer abbauten, wiesen eine deutlich niedrigere spezifische GPDH-Aktivität auf, die eher im Bereich der PA lag, während bei den schnell abbauenden A bis zu dreifach höhere Aktivitätswerte vorlagen.

4.2.10 Ang-(3-7)

Der Abbau von Ang-(3-7) verlief in den ersten 6 Stunden bei PA und A fast parallel (siehe Abbildung 18). Beide Zellarten hatten zu diesem Zeitpunkt etwa ein Drittel des ursprünglich vorhandenen Ang-(3-7) hydrolysiert. Erst nach 6 Stunden bauten die A das Peptid schneller ab, so dass sich die HWZ mit 13 Stunden für PA und 10 Stunden für A unterschieden (siehe Tabelle 7). Nach 24 Stunden hatten die A Ang-(3-7) zu über 90 % und nach 48 Stunden fast vollständig eliminiert. Bei den PA waren zu den gleichen Zeitpunkten noch 25 % und 7 % des Peptids vorhanden. Sowohl bei den PA als auch bei den A entstand erstmals nach 3 Stunden ein neuer Peak mit einer Retentionszeit von 8 min. Dieser erreichte nach 24 Stunden bei beiden Zelltypen seinen höchsten Wert, korrelierend mit dem weit fortgeschrittenen Abbau von Ang-(3-7), und nahm dann wieder ab.

A)



B)

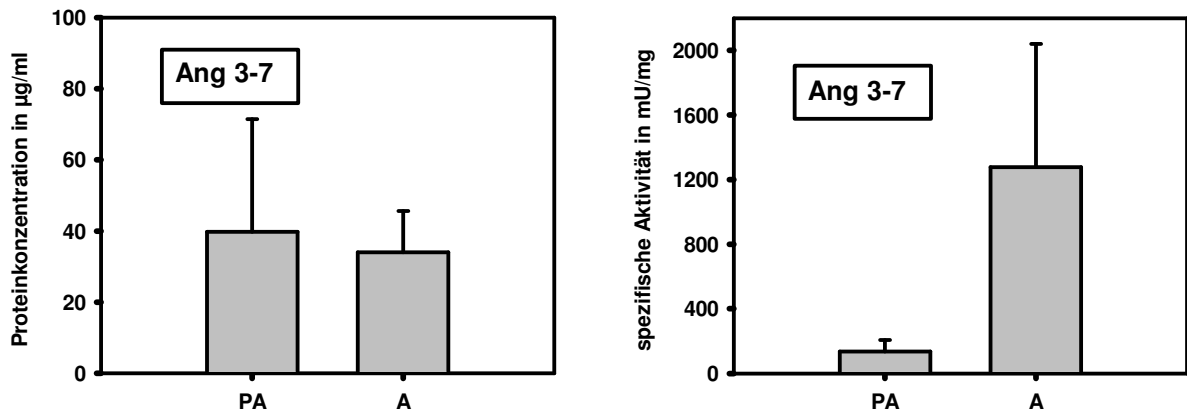


Abbildung 18: Ang-(3-7) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von Ang-(3-7) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben. a) Hydrolyse von Ang-(3-7); b) Synthese eines nicht identifizierten Peptids mit der Retentionszeit von 8 min.

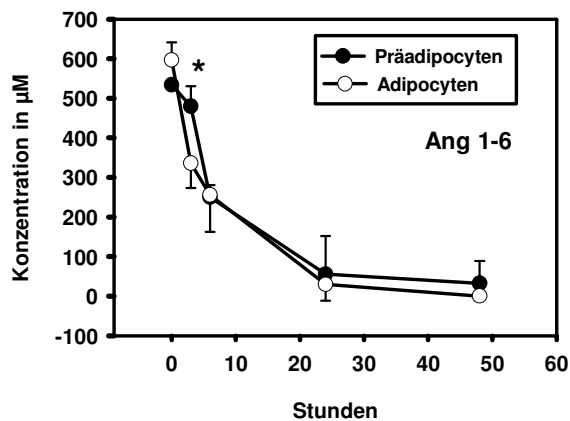
B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n=3$

4.2.11 Ang-(1-6)

Ang-(1-6) hat eine verhältnismäßig kurze HWZ von 6 Stunden (PA), bzw 4 Stunden (A) (siehe Tabelle 7). Die A hydrolysierten in den ersten 6 Stunden etwa die vierfache Menge an Ang-(1-6) im Vergleich zu den PA. Danach verlangsamte sich die Abbaugeschwindigkeit der A auf das Niveau der PA, so dass die Kurven nun weitgehend parallel verliefen. Nach 48 Stunden konnten die A das Peptid vollständig und die PA zu 94 % abbauen. Auch hier wurden keine neu entstandenen Fragmente detektiert.

A)



B)

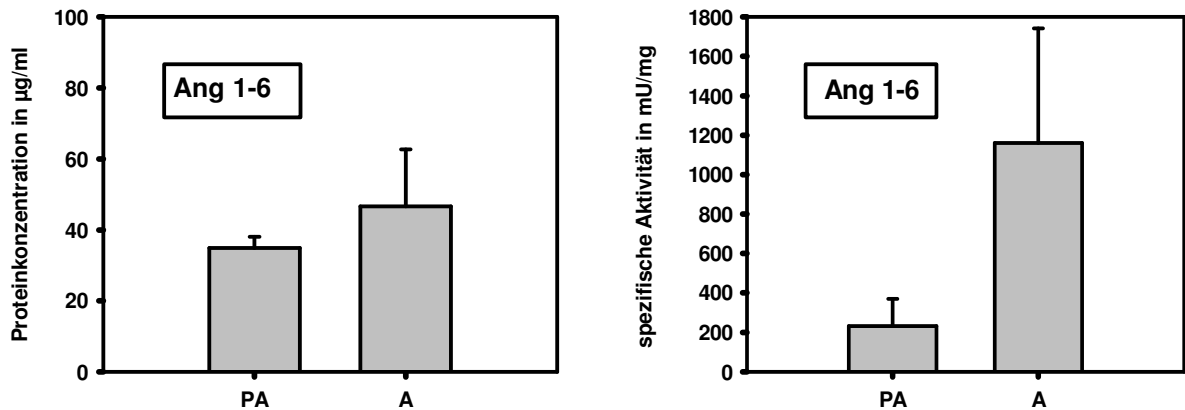


Abbildung 19: Ang-(1-6) - Abbaukinetik, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von Ang-(1-6) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben.

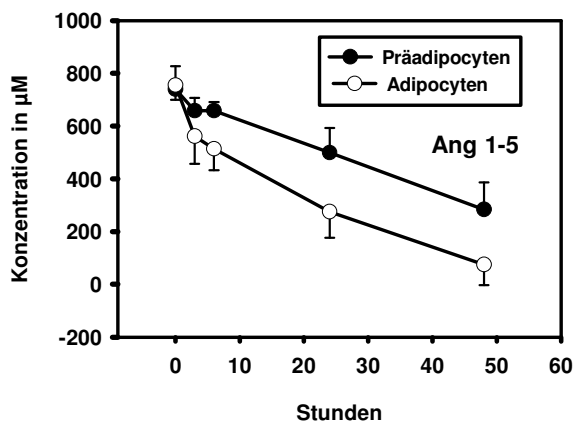
B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n=3$

4.2.12 Ang-(1-5)

Der Abbau von Ang-(1-5) verlief sehr langsam. Die PA brauchten 45 Stunden um 50 % des zugegebenen Peptids zu hydrolysieren. Zum Zeitpunkt der letzten Messung nach 48 Stunden hatten sie erst 60 % der Anfangsmenge an Ang-(1-5) eliminiert. Der Abbau durch die A verlief mit einer HWZ von 16 Stunden schneller. In den ersten 3 Stunden konnten die A bereits ein Viertel der Ang-(1-6)-Menge eliminieren. Nach 48 Stunden waren über 90 % abgebaut worden. Beim Abbau von Ang-(1-5) entstanden keine detektierbaren Fragmente.

A)



B)

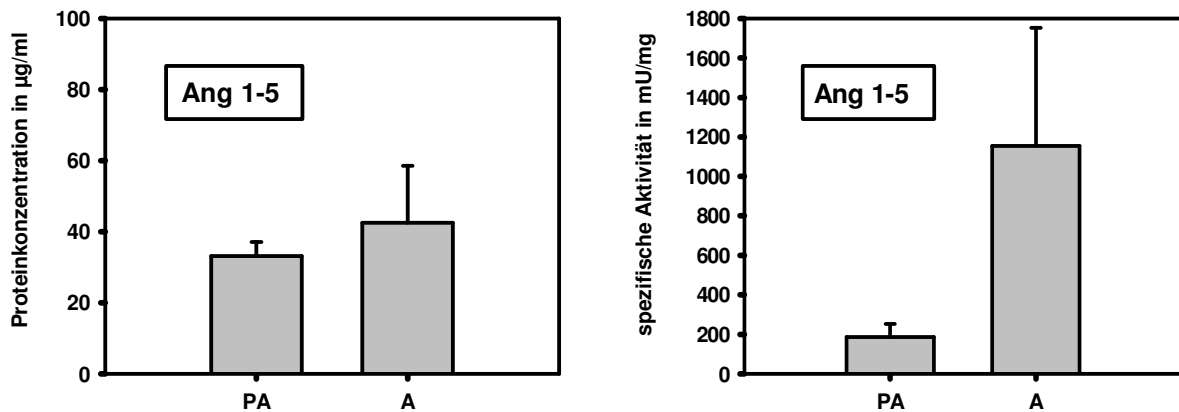


Abbildung 20: Ang-(1-5) - Abbaukinetik, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: zeitlicher Verlauf der Hydrolyse von Ang-(1-5) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben.

B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n=3$

4.2.13 Halbwertszeiten der Abbaukinetiken für PA und A

<u>Ang-Peptid</u>	<u>PA – Stunden (h)</u>	<u>A – Stunden (h)</u>
Ang-(1-13)	20	2
Ang-(1-10)	13	9
Ang-(2-10)	12	9
Ang-(1-9)	7	3
Ang-(2-8)	8	3
Ang-(3-8)	10	6
Ang-(4-8)	4	3
Ang-(5-8)	3	2
Ang-(1-7)	18	3 / (17)*
Ang-(3-7)	13	10
Ang-(1-6)	6	4
Ang-(1-5)	45	16

Tabelle 7: Vergleich der Halbwertszeiten der Hydrolyse verschiedener Ang-Peptide im Vergleich PA und A

Es wurden die beiden Zeitpunkte betrachtet, zwischen denen der 50 %-Wert der Hydrolyse liegt und dazwischen ein linearer Abbau angenommen. * Trotz Induktion der Adipogenese wurde bei zwei Zellpopulationen kaum eine Differenzierung beobachtet (siehe Abbildung 17 C).

4.3 Inhibitorversuche

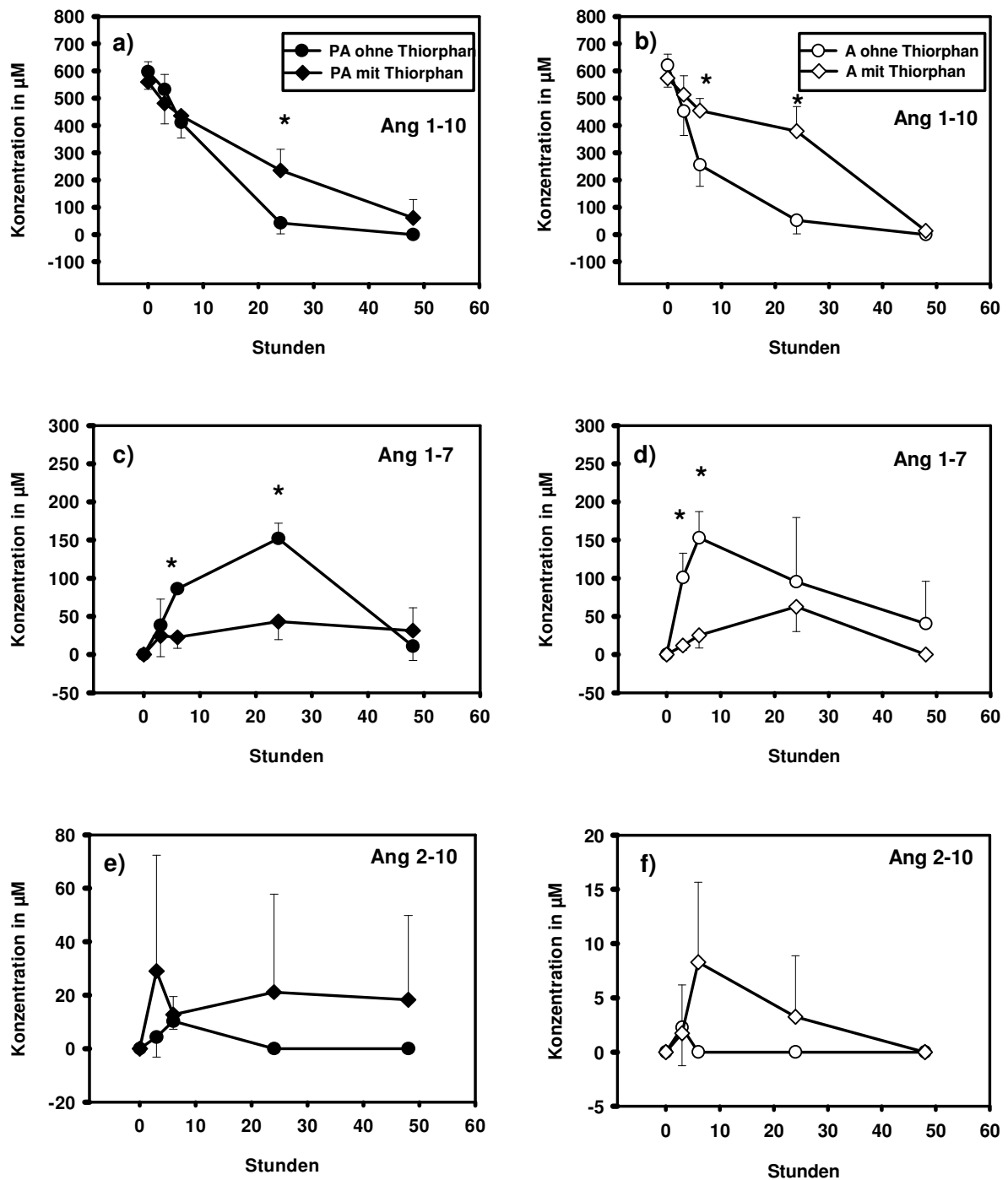
Nachdem die Abbaukinetiken der verschiedenen Angiotensine und die dabei neu entstehenden Peptide identifiziert waren, wurde versucht, die daran beteiligten Enzyme näher zu bestimmen. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Frage gelegt, ob diese Enzyme inhibiert werden können und welchen Einfluss diese Inhibition auf den Abbau und die Neusynthese der verschiedenen Ang-Peptide hätte. Untersucht wurden die längeren Angiotensine Ang-(1-10), Ang-(1-9), Ang-(2-10), Ang-(2-8) und Ang-(3-8), da deren Abbauprodukte bereits identifiziert waren (siehe 4.2) und entweder sie selbst oder die bei ihrem Abbau neu auftretenden Peptide biologische Wirkung besitzen (siehe 1.3). Die gewählten Aminopeptidase-Inhibitoren Amastatin und Bestatin, sowie der Carboxypeptidase-Inhibitor PCI sind relativ unspezifisch und zählen eine große Anzahl Aminopeptidasen, bzw. Carboxypeptidasen zu ihren Substraten. Lediglich Thiorphan ist ein relativ spezifischer Inhibitor von Neprilysin (Roques et al. 1983).

4.3.1 Ang-(1-10)

Die Zugabe von 100 μ M des Neprilysin-Inhibitors Thiorphan führte zu einer deutlichen Verlangsamung des Ang-(1-10)-Abbaus sowohl bei A als auch bei PA (siehe Abbildung 21). Bei den A, die das Peptid schneller abbauten, wurde dies bereits früher und stärker deutlich: So waren nach 3 Stunden erst 10 % und nach 6 Stunden 21 % des zugegebenen Ang-(1-10) hydrolysiert (im Gegensatz zu 27 % und 59 % ohne Zugabe des Inhibitors). Nach 24 Stunden waren immer noch 56 % des Peptids vorhanden, erst nach 48 Stunden war Ang-(1-10) fast vollständig abgebaut. Bei den PA zeigte sich erst 6 Stunden nach Zugabe des Inhibitors ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollgruppen. Während der ersten Stunden verliefen die Kurven noch parallel, der 6-Stunden-Wert zeigte einen um 10 % geringeren Abbau unter Thiorphan. Am deutlichsten wichen die Kurven zum Zeitpunkt 24 Stunden voneinander ab: Hier konnte bei den inhibierten Zellen die sechsfache Menge an Ang-(1-10) im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden. Nach 48 Stunden waren immer noch 18 % des zugegebenen Peptids vorhanden, während die Kontrollgruppen es bis dahin vollständig hydrolysiert hatten. Nach Zugabe von 100 μ M des Inhibitors Thiorphan kam es bei PA und A auch zu einer signifikanten Abnahme der Ang-(1-7)-Bildung. Die PA bildeten zu den Zeitpunkten 3 und 6 Stunden nur jeweils 4 % und nach 24 Stunden 8 % des Ausgangswertes von Ang-(1-10) und erreichten damit lediglich ein Drittel bis die Hälfte der Werte der Kontrollgruppe. Der

Zeitpunkt der Bildung des höchsten Wertes blieb unverändert bei 24 Stunden. Nach Thiorphan-Inhibition kam es zu einer vermehrten Akkumulation von Ang-(1-7), die bei den A bis 24 Stunden reichte und bei den PA nach 48 Stunden den Wert der Kontrollgruppe übertrifft. Für die HWZ siehe Tabelle 8.

A)



B)

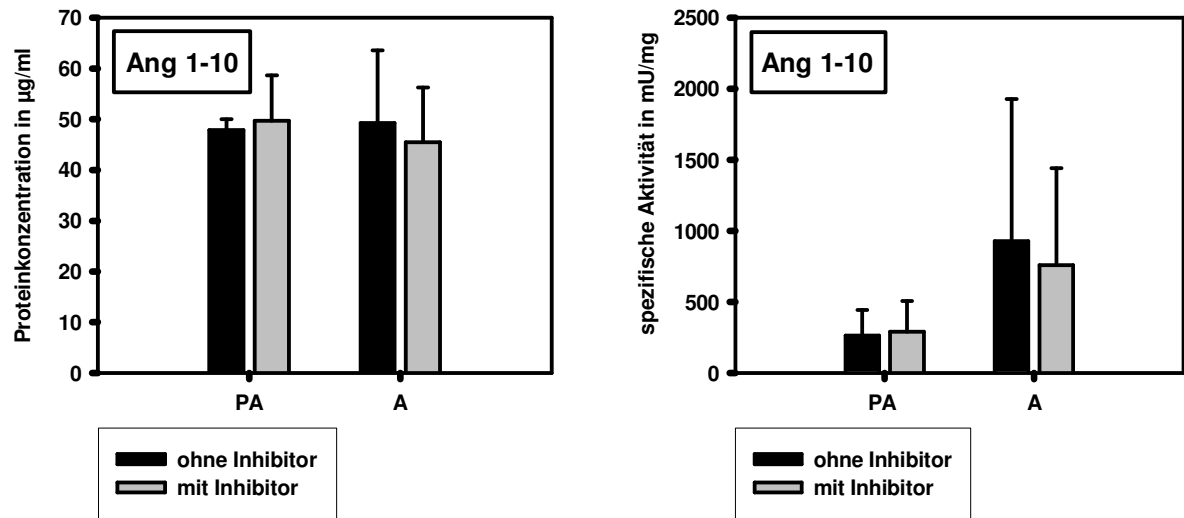


Abbildung 21: Ang-(1-10) – Abbaukinetik nach Zugabe von 100 µM Thiorphan, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: Einfluss von 100 µM Thiorphan auf die Hydrolyse von Ang-(1-10) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben. a) b): Hydrolyse von Ang-(1-10) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Thiorphan; c) d): Synthese von Ang-(1-7) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Thiorphan; e) f): Synthese von Ang-(2-10) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Thiorphan.

B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n=3$

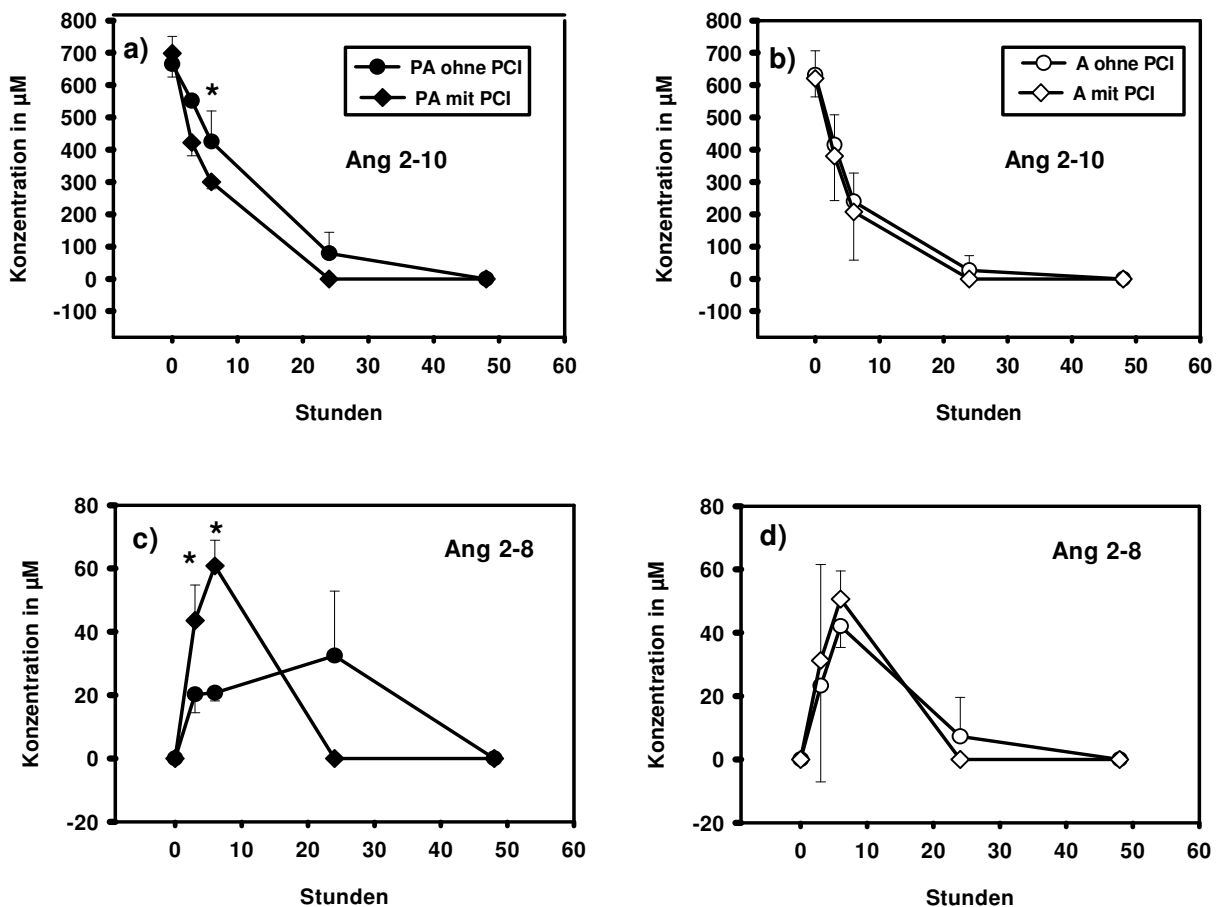
Bei den A fiel die Hemmung der Ang-(1-7)-Synthese noch deutlicher aus: So entstanden nach 3 Stunden lediglich 2 % und nach 6 Stunden 4 % des 0h Wertes von Ang-(1-10). Damit wurden lediglich 12,5 %, bzw. 16,5 % der Werte der Kontrollgruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten erreicht. Auch wurde der Maximalwert erst nach 24 Stunden und nicht bereits nach 6 Stunden gebildet.

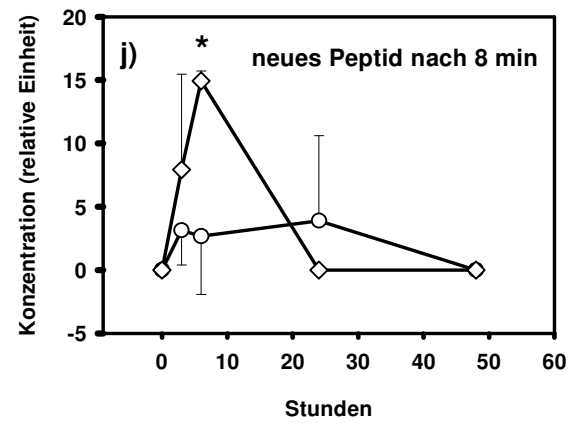
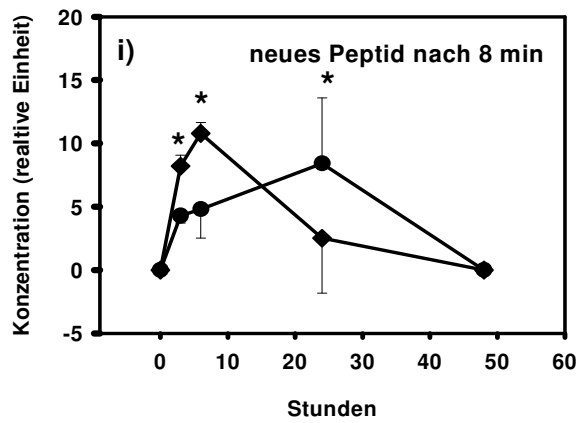
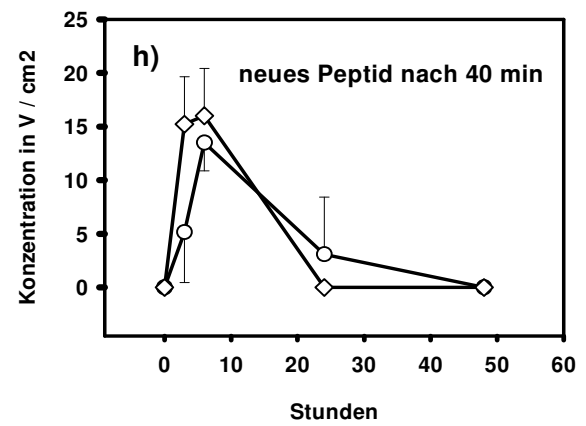
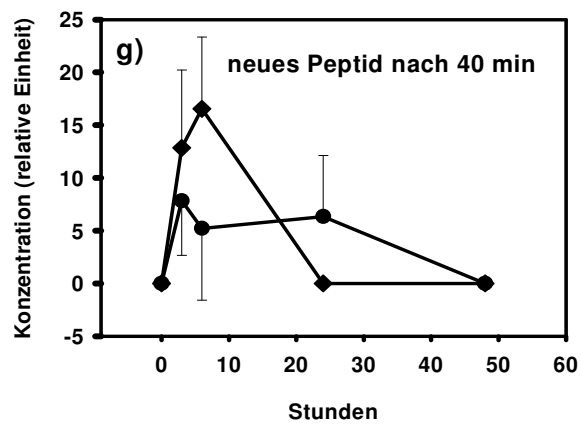
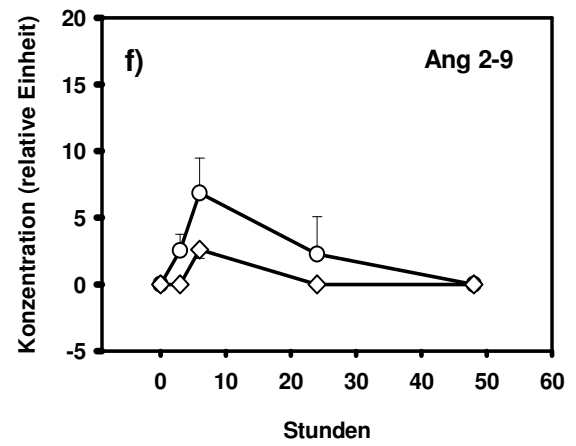
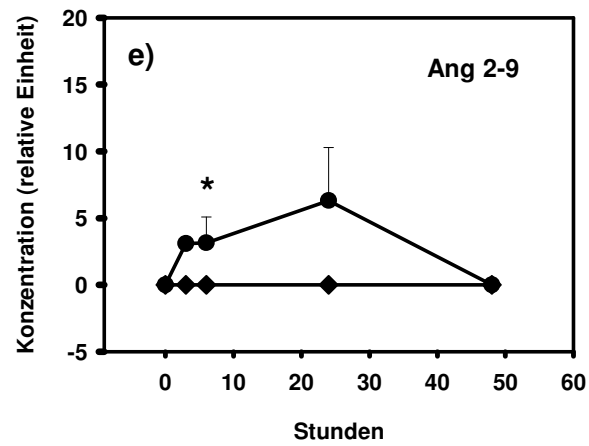
Während bei den Kontrollgruppen nur eine vereinzelte Bildung von Ang-(2-10) detektiert werden konnte, kam es nach Gabe von Thiorphan bei allen untersuchten PA und A zu einer Zunahme der Bildung von Ang-(2-10). Allerdings geschah dies oft zu verschiedenen Zeitpunkten und da Ang-(2-10) schnell wieder abgebaut wurde, konnte bisweilen in einer Präparation bereits kein Peptid mehr nachgewiesen werden, während eine andere Zellpopulation gerade ihr Maximum bildete. Aus diesem Grund ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

4.3.2 Ang-(2-10)

PA und A reagierten unterschiedlich auf die Zugabe von 100 μM des Carboxypeptidase-Inhibitors PCI (siehe Abbildung 22). Die Hydrolyse von Ang-(2-10) durch die A wurde praktisch nicht beeinflusst. Beide Abbau-Kurven verliefen annähernd parallel. Dagegen beschleunigte sich der Abbau des Peptids durch die PA nach Zugabe des Inhibitors deutlich. In den ersten 3 Stunden nach Inhibitorzugabe wurden 40 % des zugegebenen Peptids eliminiert, während die Kontrollgruppe im selben Zeitraum nur 17 % abbauen konnte. Nach 6 Stunden hatten die inhibierten Zellen 57 % des Peptids hydrolysiert und nach 24 Stunden war Ang-(2-10) überhaupt nicht mehr nachweisbar. Die nicht inhibierten Zellen dagegen hatten nach 6 Stunden erst 36 % abgebaut und nach 24 Stunden konnten immer noch 12 % des Ang-(2-10) nachgewiesen werden. Die HWZ des Angiotensins verringerte sich nach Inhibitor-Zugabe von 11 Stunden auf 5 Stunden (siehe Tabelle 8).

A)





B)

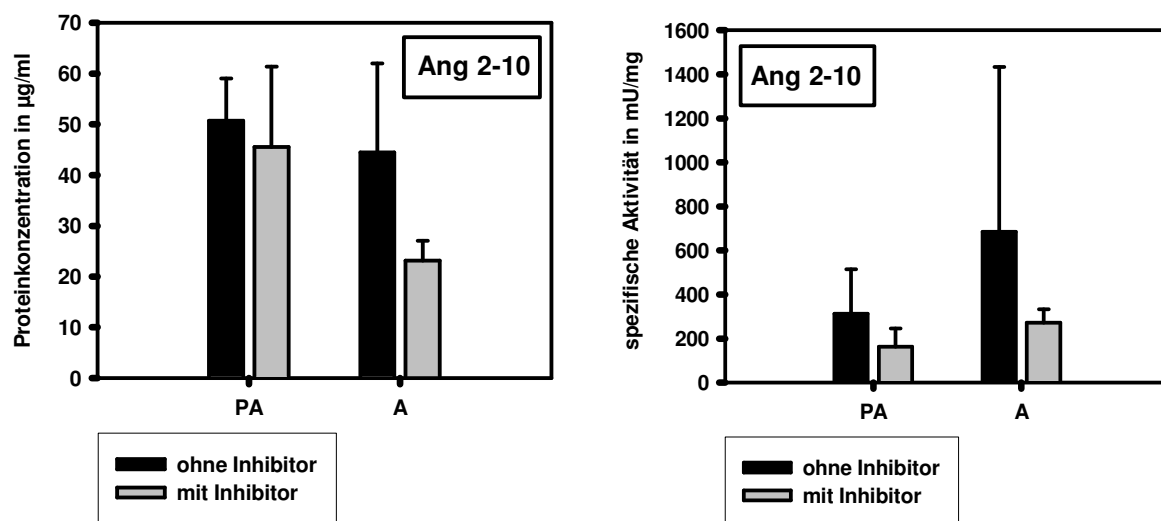


Abbildung 22: Ang-(2-10) – Abbaukinetik nach Zugabe von 100 µM PCI, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: Einfluss von 100 µM PCI auf die Hydrolyse von Ang-(2-10) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben. a) b): Hydrolyse von Ang-(2-10) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Thiorphan; c) d): Synthese von Ang-(2-8) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Thiorphan; e) f): Synthese von Ang-(2-9) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Thiorphan; g) h): Synthese eines nicht identifizierten Peptids mit der Retentionszeit 8 min durch PA und A mit und ohne Zugabe von PCI; i) j): Synthese eines nicht identifizierten Peptids mit der Retentionszeit 40 min durch PA und A mit und ohne Zugabe von PCI.

B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n=3$

Auch bei der Synthese neuer Spaltprodukte nach Inhibitorzugabe zeigten sich Unterschiede zwischen PA und A. Besonders deutlich wird dies bei Betrachtung der Peptide Ang-(2-8) und des Peptids mit der Retentionszeit 17 min, vermutlich Ang-(2-9). Auch wenn ein mengenmäßiger Vergleich beider Peptide aufgrund verschiedener Einheiten nicht möglich ist, zeigte sich bei den nicht inhibierten PA ein ähnlicher Kurvenverlauf. Beide Peptide entstanden erstmals nach 3 Stunden, durchliefen dann bis zum Zeitpunkt 6 Stunden eine Plateauphase, stiegen nach 24 Stunden nochmal leicht an und waren nach 48 Stunden vollständig verschwunden. Die Zugabe des Inhibitors PCI dagegen verhinderte die Entstehung von Ang-(2-9) vollständig und führte zu einer Zunahme der Bildung von Ang-(2-8) und zu dessen beschleunigtem Abbau. So wurde nach 3 Stunden die doppelte Menge und nach 6 Stunden die dreifache Menge an Ang-(2-8) im Zellüberstand im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden.

Bei den A dagegen zeigte sich bei der Neusynthese von Ang-(2-8) kein nennenswerter Unterschied zwischen den inhibierten und nicht inhibierten Präparationen. Auch wurde die Synthese von Ang-(2-9) durch den Inhibitor im Gegensatz zu den PA nicht vollständig

unterdrückt. So ergaben sich nach 3 und nach 6 Stunden Werte, die etwa der Hälfte der von der Kontrollgruppe produzierten Menge entsprachen.

Das nicht identifizierte Peptid mit einer Retentionszeit von 40 min wurde von den PA nach Inhibitorzugabe in zwei- bis dreifacher Menge gebildet. Dagegen unterschieden sich die Maximalwerte dieses Peptids bei den inhibierten und nicht inhibierten A nicht wesentlich, es kam lediglich zu einem langsameren Anstieg bei der Kontrollgruppe.

Lediglich das Peptid, das nach einer Retentionszeit von 8 min detektiert wurde, zeigte vergleichbare Reaktionen von PA und A auf die Zugabe von PCI. 3 und 6 Stunden nach Inhibitorzugabe bildeten die PA die doppelte und die A sogar bis zur fünffachen Menge des Peptids im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

4.3.3 Ang-(1-9)

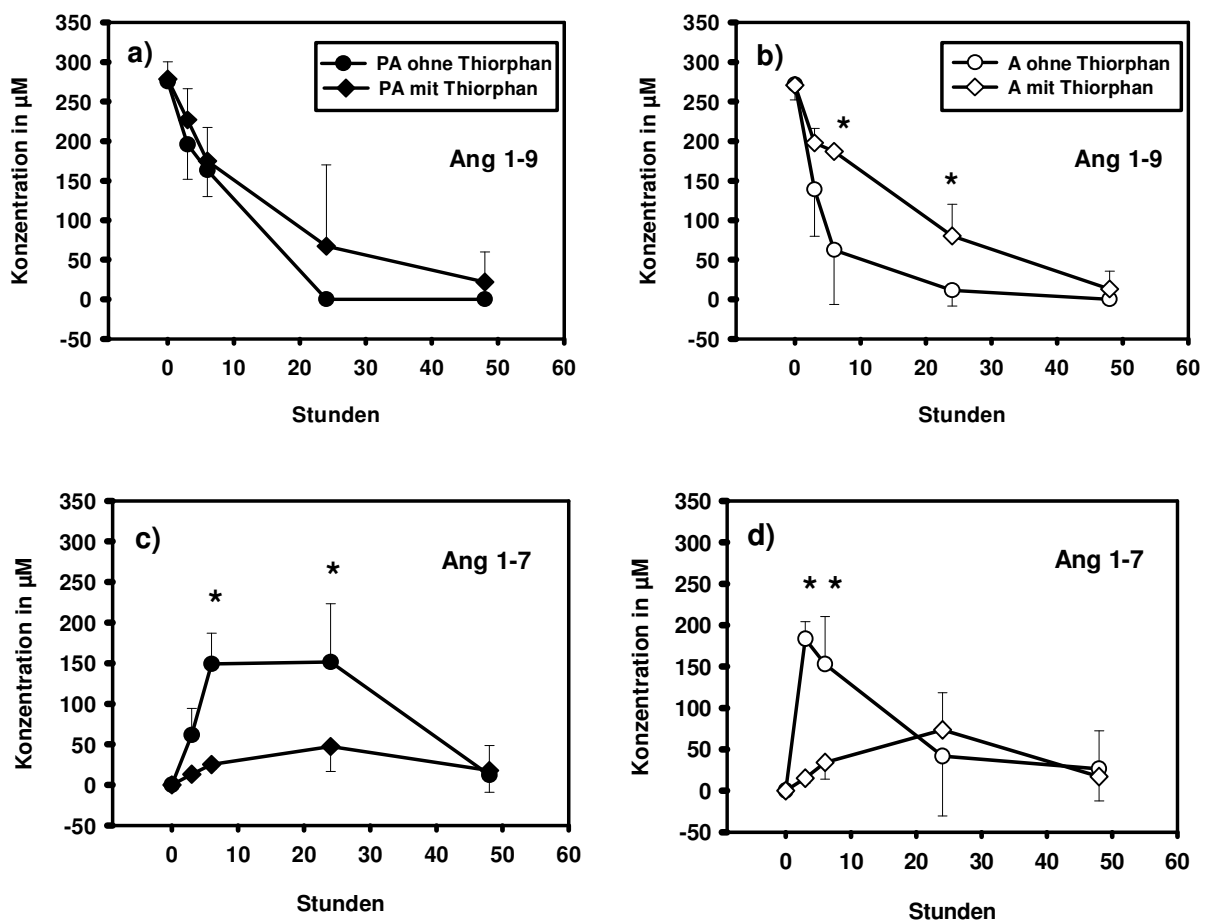
Die Zugabe von 100 μ M des Neprilysin-Inhibitors Thiorphan führte vor allem bei den A zu einer deutlichen Verlangsamung der Ang-(1-9)-Hydrolyse (siehe Abbildung 23). Nach 3 Stunden waren lediglich 31 % des Peptids umgesetzt. Nach 24 Stunden waren immer noch 30 % des Ang-(1-9) vorhanden, erst nach 48 Stunden kam es zu einem vollständigen Verschwinden des Peptids. Die Kontrollgruppe konnte nach 3 Stunden bereits 50 % und nach 6 Stunden mehr als 75 % des Peptids abbauen. Für die HWZ siehe Tabelle 8.

Der Ang-(1-9)-Abbau durch die PA wurde durch Thiorphan nur geringfügig beeinflusst. Zwei der drei untersuchten Präparationen zeigten keine nennenswerten Unterschiede zu den Kontrollgruppen. Lediglich eine PA-Population reagierte deutlich auf die Zugabe des Inhibitors: Hier kam es in den ersten 3 Stunden zu einer kompletten Hemmung des Ang-(1-9)-Abbaus, nach weiteren 3 Stunden waren lediglich 12 %, nach 24 Stunden 24 % und nach 48 Stunden 76 % des Peptids verschwunden. Aufgrund der niedrigen Fallzahl und der sehr unterschiedlichen Reaktion der untersuchten Zellpopulationen konnten hier aber keine signifikanten Unterschiede erhoben werden.

Die Zugabe des Inhibitors Thiorphan führte zu einer deutlichen Minderung der Ang-(1-7)-Bildung, sowohl bei den A, als auch bei den PA, die mit dem verlangsamten Abbau von Ang-(1-9) korrelierte. Ihr Maximum an Ang-(1-7) bildeten die PA nach 24 Stunden, blieben allerdings mit 17 % des Ausgangswertes von Ang-(1-9) deutlich hinter dem Maximalwert von 55 % der Kontrollgruppe zurück. In den ersten 6 Stunden verlief der Anstieg an neu gebildetem Peptid auch deutlich zögerlicher und erreichte nur ein Viertel, bzw. ein Sechstel der Kontrollgruppe. Bei den A verschob sich nach Thiorphan-Zugabe neben der Verringerung der Ang-(1-7)-Synthese zusätzlich noch der Zeitpunkt des

Maximalwertes von Ang-(1-7) auf 24 Stunden. Nach 3 Stunden erreichte die Konzentration des neu gebildeten Peptids lediglich 6 % der Ausgangskonzentration an Ang-(1-9), während die Kontrollgruppe zum selben Zeitpunkt bereits ihr Maximum mit 68 % bilden konnte. Nach weiteren 3 Stunden verdoppelte sich die Menge an Ang-(1-7), erreichte aber dennoch nur ein Fünftel der nicht inhibierten Zellen. Erst zum Zeitpunkt 24 Stunden erreichten die inhibierten Zellen ihren Maximalwert von 27 % und bildeten mehr Ang-(1-7) als die Kontrollgruppe, deren Peptid zum Großteil aber bereits wieder abgebaut war.

A)



B)

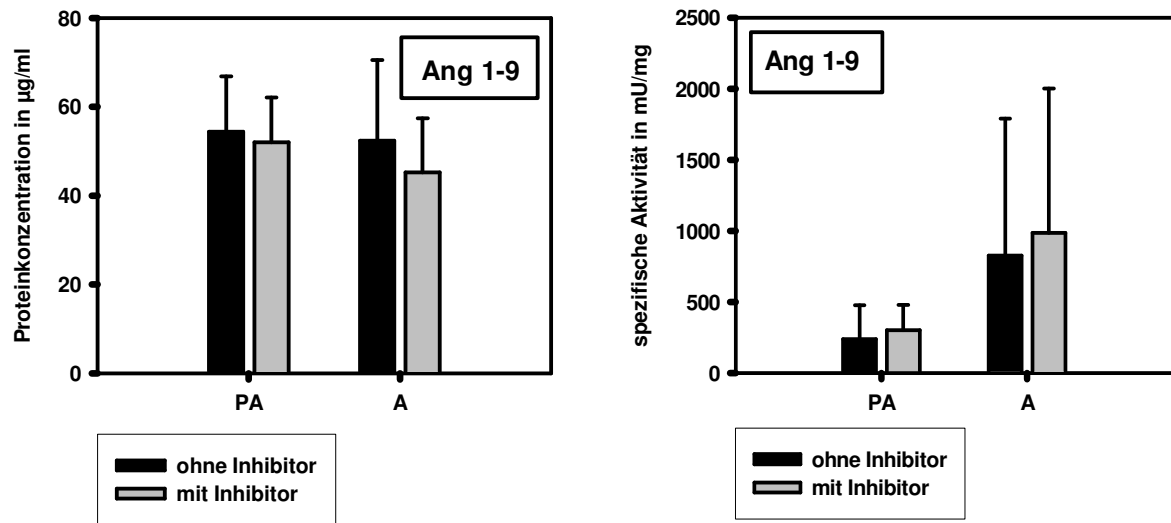


Abbildung 23: Ang-(1-9) – Abbaukinetik nach Zugabe von 100 µM Thiorphan, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: Einfluss von 100 µM Thiorphan auf die Hydrolyse von Ang-(1-9) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben. a) b): Hydrolyse von Ang-(1-9) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Thiorphan; c) d): Synthese von Ang-(1-7) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Thiorphan.

B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

* : signifikante Unterschiede zwischen PA und A mit $p < 0,05$, $n=3$

4.3.4 Ang-(2-8) und Ang-(3-8) mit Bestatin

Die Zugabe von 100 µM des Aminopeptidase-Inhibitors Bestatin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den Abbau von Ang-(2-8) und -(3-8), sowie die Entstehung neuer Peptide. So waren beim Abbau von Ang-(2-8) weder bei den PA noch bei den A Unterschiede zu den Kontrollgruppen zu erkennen. Auch der Abbau von Ang-(3-8) blieb bei den PA durch die Inhibitorgabe unbeeinflusst. Lediglich die A reagierten auf Bestatin mit einer Beschleunigung des Umsatzes von Ang-(3-8) und einer Herabsetzung der HWZ von 7 auf 4 Stunden. Die Gabe von Bestatin führte bei den PA generell zu einer leichten Erhöhung der Abbauprodukte Ang-(3-8), bzw. Ang-(4-8) und Ang-(5-8), die allerdings nicht signifikant waren. Bei den A waren diese Unterschiede nicht zu erkennen.

4.3.5 Ang-(2-8) und Ang-(3-8) mit Amastatin

Nachdem der Aminopeptidase-Inhibitor Bestatin kaum Wirkung zeigte, wurden in einer weiteren Versuchsreihe 100 µM Amastatin, ein weiterer Vertreter der Aminopeptidase-Inhibitoren mit etwas abweichendem Substrat-Spektrum, eingesetzt und

dessen Wirkung auf die Umsetzung von Ang-(2-8) und Ang-(3-8) untersucht. Die dabei beobachteten Veränderungen nach der Inhibitorgabe zeigten sich deutlich bei allen untersuchten PA- und A-Populationen, auch wenn sie sich aufgrund des geringen experimentellen Umfangs (n=2) nicht statistisch überprüfen lassen.

Ang-(2-8)

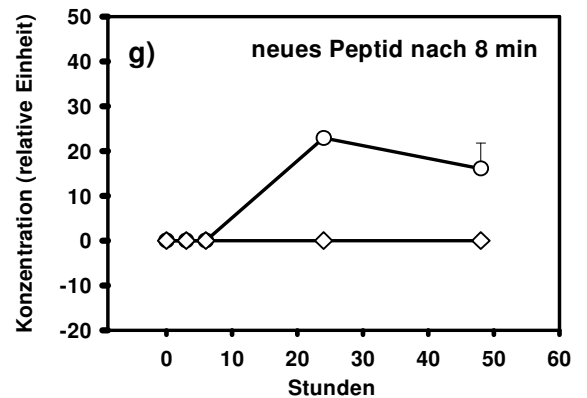
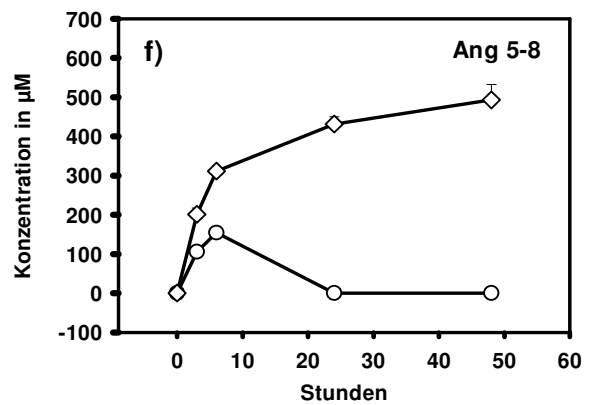
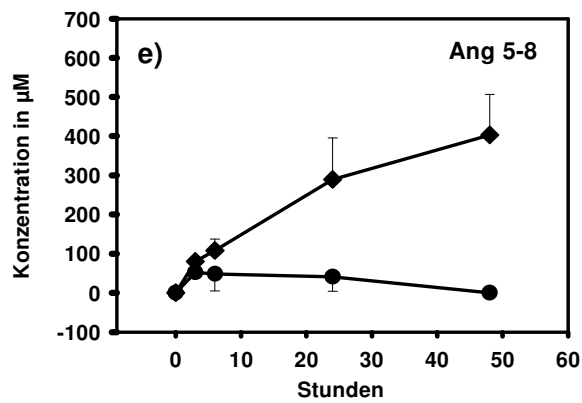
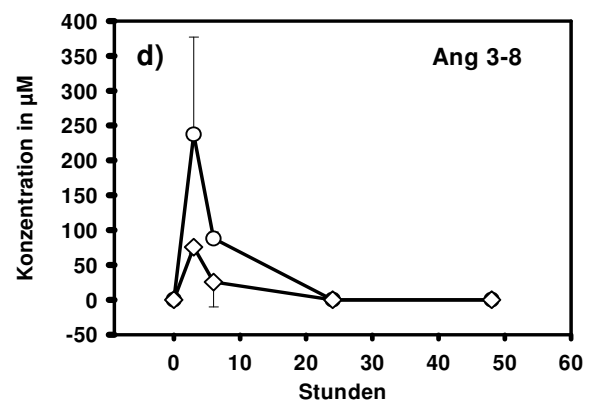
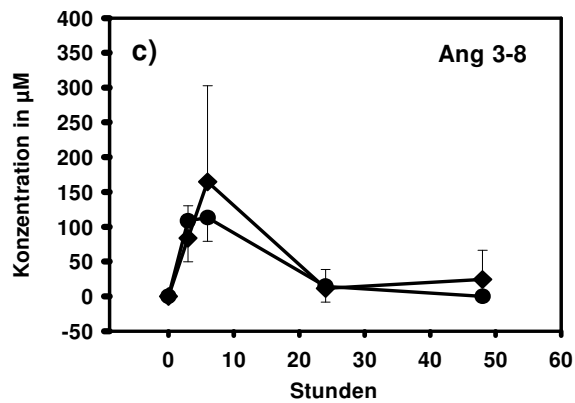
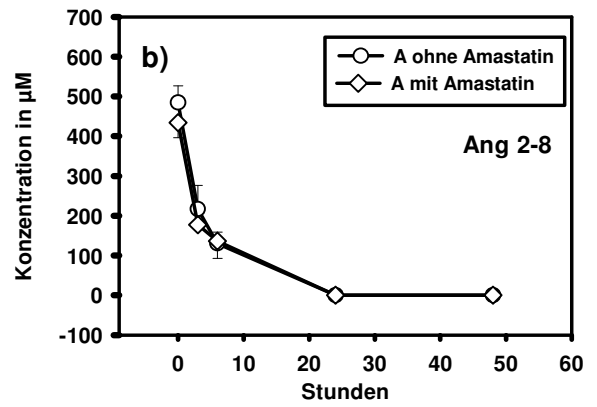
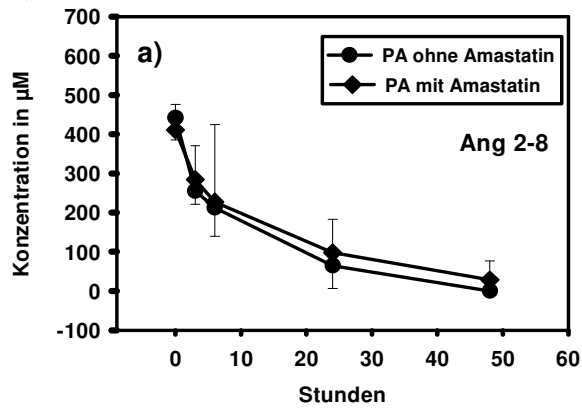
Die Zugabe von 100 µM Amastatin verzögerte den Abbau von Ang-(2-8) durch die PA leicht (siehe Abbildung 24). So bauten die inhibierten Zellen in den ersten 6 Stunden etwa 40 % des zugegebenen Peptids ab, wofür die Kontrollgruppe nur 3 Stunden brauchte. Die HWZ verdoppelte sich nach Inhibitorzugabe von 5 auf 10 Stunden (siehe Tabelle 8). Der Ang-(2-8)-Abbau durch die A wurde durch Amastatin nicht beeinflusst.

Über die Bildung des Fragmentes Ang-(3-8) lässt sich aufgrund stark schwankender Kinetik, unterschiedlicher Peptidmenge und Hydrolyse-Geschwindigkeit der einzelnen PA- und A-Populationen keine verlässliche Aussage machen. Die Abbildungen geben lediglich die Mittelwerte wieder.

Deutlich unterschied sich dagegen die Synthese des Peptids Ang-(5-8) nach Zugabe des Inhibitors. Bei den nicht inhibierten PA erschien nach 3 Stunden das Peptid in einer Menge, die etwa 10 % des 0 h-Wertes von Ang-(2-8) entsprach. Diese Konzentration blieb bis zum Zeitpunkt 24 Stunden relativ konstant und wurde anschließend wieder vollkommen abgebaut. Die A bildeten die doppelte bis dreifache Menge an Ang-(5-8) und hydrolysierten sie auch schneller wieder. Die Hydrolyse des neu entstandenen Peptids unterblieb nach Zugabe des Inhibitors sowohl bei den PA als auch bei den A. Bei den inhibierten PA kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Ang-(5-8)-Konzentration. Nach 24 Stunden erreichte diese bereits 70 % und nach 48 Stunden 100 % der Ausgangskonzentration an Ang-(2-8). Noch schneller verlief die Entstehung des Peptids durch die A. Hier wurden nach 3 Stunden bereits knapp 50 %, nach 24 Stunden 100 % und nach 48 Stunden 113 % des 0 h-Wertes an Ang-(2-8) gemessen.

Bei den nicht inhibierten A wurde ab dem Zeitpunkt 24 Stunden, korrelierend mit dem Verschwinden der Ang-Peptide, ein neu entstandener Peak mit der Retentionszeit 8 min gemessen, der nach Zugabe von Amastatin ausblieb.

A)



B)

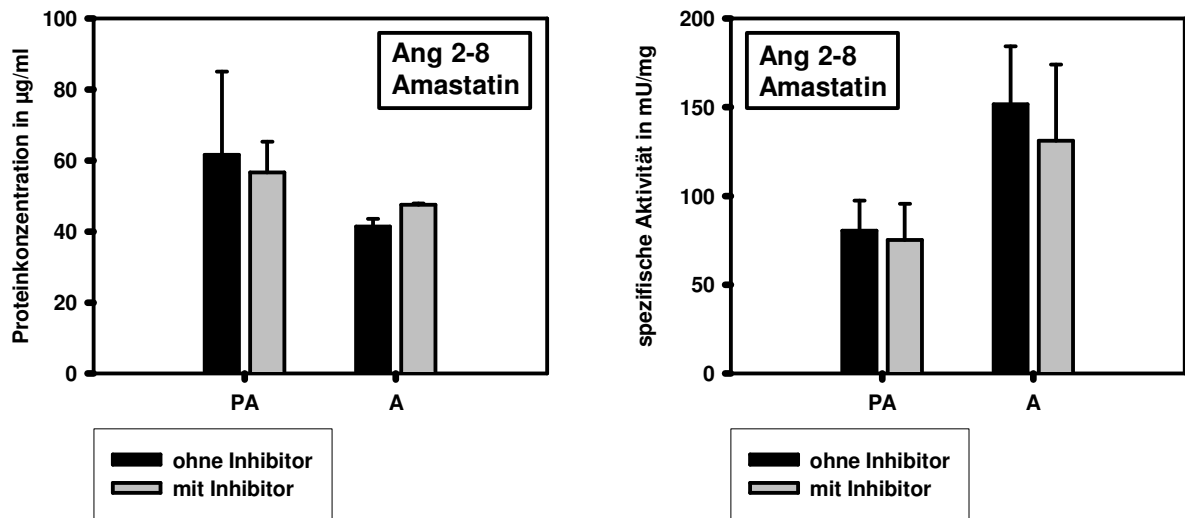


Abbildung 24: Ang-(2-8) – Abbaukinetik nach Zugabe von 100 µM Amastatin, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: Einfluss von 100 µM Amastatin auf die Hydrolyse von Ang-(2-8) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben. (n=2). a) b): Hydrolyse von Ang-(2-8) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Amastatin; c) d): Synthese von Ang-(3-8) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Amastatin; e) f): Synthese von Ang-(5-8) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Amastatin; g): Synthese eines nicht identifizierten Peptids mit der Retentionszeit von 8 min durch PA und A mit und ohne Zugabe von Amastatin.

B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

Ang-(3-8)

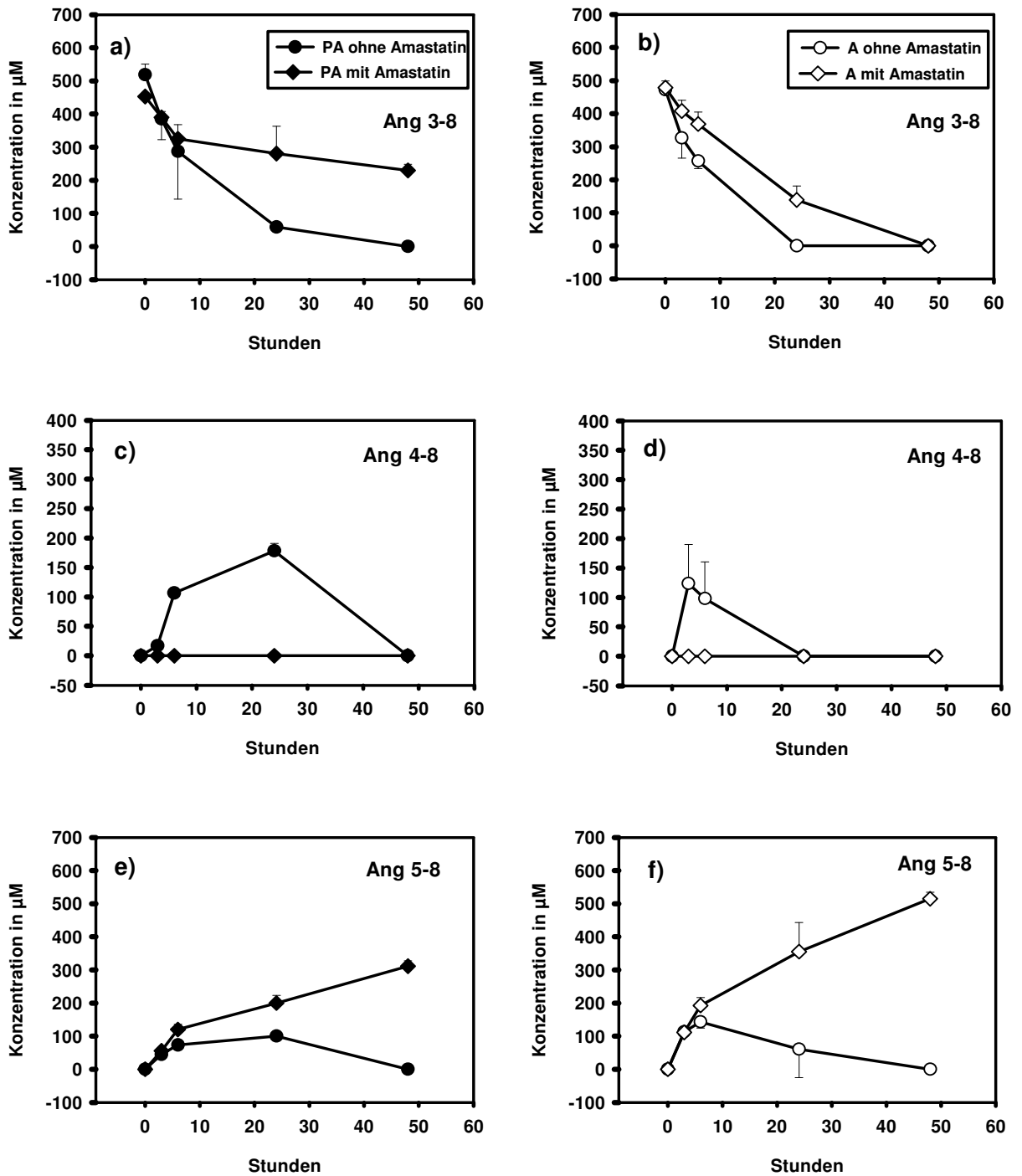
Noch deutlicher wirkte sich die Zugabe von 100 µM Amastatin bei PA und A auf die Hydrolyse von Ang-(3-8) und die dabei neu entstehenden Ang-Peptide aus (siehe Abbildung 25). So wurde die Abbaugeschwindigkeit von Ang-(3-8) deutlich verlangsamt. Die HWZ versechsfachte sich bei den inhibierten PA im Vergleich zur Kontrollgruppe von 8 auf 48 Stunden und nahm auch bei den inhibierten A von 7 auf 16 Stunden und damit mehr als das Doppelte zu (siehe Tabelle 8).

Während des Abbaus von Ang-(3-8) bildeten die Kontrollgruppen das Peptid Ang-(4-8) in einer Konzentration, die etwa einem Drittel (PA) bis einem Viertel (A) der ursprünglichen Menge an Ang-(3-8) entsprach. Nach Zugabe von Amastatin, unterblieb die Synthese von Ang-(4-8) vollständig. Die hohen Standardabweichungen bei den A wurden durch die unterschiedliche Menge an neu synthetisiertem Ang-(4-8) der beiden nicht inhibierten Präparationen verursacht.

Die Zugabe von Amastatin hatte auf das neu entstandene Ang-(5-8) ähnliche Effekte wie bereits bei der Hydrolyse von Ang-(2-8) beobachtet: Das Peptid erreichte bei den nicht inhibierten Kontrollgruppen nach 6 Stunden (A), bzw. 24 Stunden (PA) seinen höchsten

Wert und wurde anschließend wieder abgebaut. Diese Hydrolyse von Ang-(5-8) fand nach Zugabe von Amastatin nicht mehr statt. Stattdessen stieg die Konzentration an Ang-(5-8) kontinuierlich an und erreichte bei den PA einen 48 h-Wert von 70 % des ursprünglich vorhandenen Ang-(2-8). Bei den Adipocysten betrug der 48 h-Wert von Ang-(5-8) 108 % des Ausgangswertes von Ang-(2-8).

A)



B)

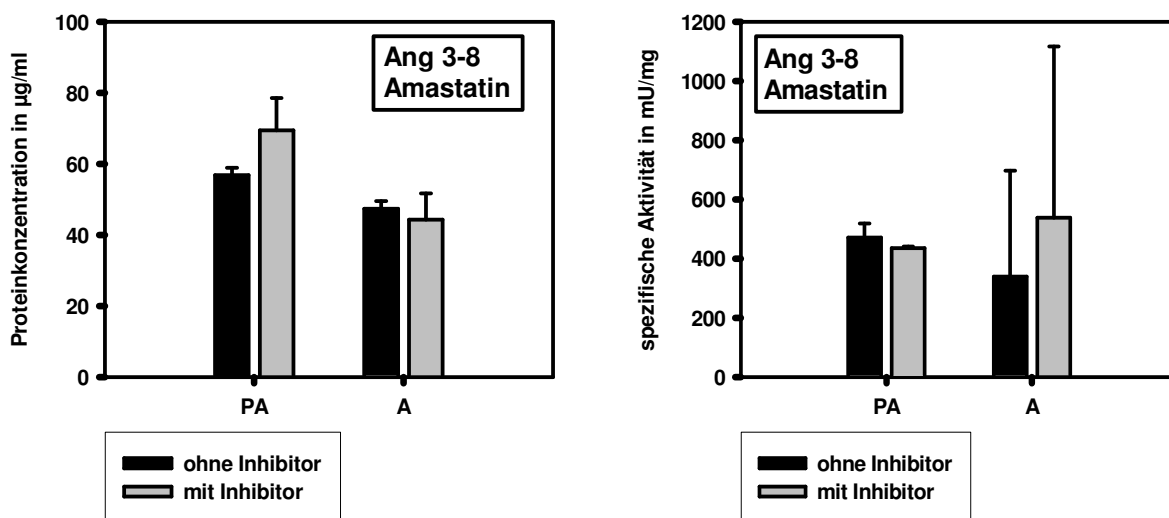


Abbildung 25: Ang-(3-8) – Abbaukinetik nach Zugabe von 100 µM Amastatin, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A

A: Einfluss von 100 µM Amastatin auf die Hydrolyse von Ang-(3-8) im Vergleich PA und A. Versuchsablauf wie in 3.1, 3.4, 3.5 beschrieben (n=2). a) b): Hydrolyse von Ang-(3-8) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Amastatin; c) d): Synthese von Ang-(4-8) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Amastatin; e) f): Synthese von Ang-(5-8) durch PA und A mit und ohne Zugabe von Amastatin;

B: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der PA und A (siehe 3.2, 3.3).

4.3.6 Halbwertszeiten der Inhibitionsversuche für PA und A

<u>Ang-Peptid</u>	<u>Inhibitor</u>	<u>PA mit / ohne Inh</u> <u>Stunden (h).</u>	<u>A mit / ohne Inh</u> <u>Stunden (h).</u>
Ang-(1-10)	Thiorphan	11 / 19	5 / 30
Ang-(2-10)	PCI	11 / 5	5 / 4
Ang-(1-9)	Thiorphan	7 / 13	3 / 8
Ang-(2-8)	Bestatin	5 / 4	2 / 2
Ang-(2-8)	Amastatin	5 / 10	3 / 2,5
Ang-(3-8)	Bestatin	7 / 9	4 / 3
Ang-(3-8)	Amastatin	8 / 48	7 / 16

Tabelle 8: Änderung der Halbwertszeiten der untersuchten Ang-Peptide für PA und A nach Zugabe der Inhibitoren

Nebeneinander gestellt sind jeweils die HWZ der Kontrollgruppen im Vergleich zu den inhibierten Zellen für PA und A. Es wurden die beiden Zeitpunkte betrachtet, zwischen denen der 50 %-Wert der Hydrolyse liegt und dazwischen ein linearer Abbau angenommen.

4.4 Western-Blot-Versuche

Nachdem die Abbau- und Synthesekinetiken der einzelnen Ang-Peptide durch PA und A untersucht waren, sollte in einer weiteren Versuchsreihe das Verhalten des Ursprungsproteins Angiotensinogen (AGT) gezeigt werden. Da es nicht möglich war, AGT und seine Fragmente in der HPLC nachzuweisen, wurde auf die Methode der Gelelektrophorese mit nachfolgendem Western Blot und immunologischem Proteinnachweis mit Hilfe eines polyclonalen primären Autoantikörpers gegen humanes Angiotensinogen zurückgegriffen. Da ein Antikörper gegen humanes AGT nicht käuflich erhältlich ist, wurden verschiedene Arbeitsgruppen, die mit AGT-AK aus Eigenproduktion erfolgreich arbeiteten, kontaktiert. Von Dr. Philip McTernan, University of Warwick, U.K., erhielten wir so ein Aliquot eines polyclonalen anti-humanen AGT-Antikörpers.

Dass dieser AK in der Lage ist, humanes AGT immunhistochemisch nachzuweisen, wurde durch Dr. Philip McTernan und seine Arbeitsgruppe bereits bewiesen (Harte et al. 2003).

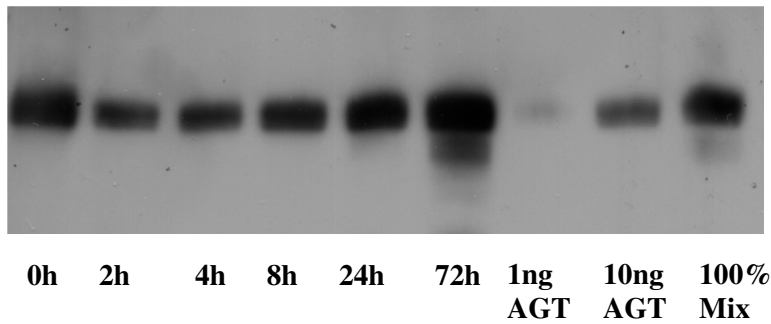
Es wurde zum einen untersucht, ob PA und A AGT spontan neu synthetisieren, zum anderen, ob die Zellen hinzugegebenes AGT abbauen.

4.4.1 AGT-Abbau

Um zu untersuchen, ob PA und A hinzugegebenes AGT abbauen, wurden den Zellen pro 10 cm²-Kulturschale 1,5 ml SD₆-Medium mit 10 µg/ml (ca. 0,174 mM) AGT hinzugefügt und zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h und 48 h jeweils 100 µl Überstand abpipettiert und nach Methanol-Chloroform-Fällung und Auftrennung durch SDS-PAGE durch immunologische Detektion wie unter 3.5, 3.7 und 3.8 beschrieben auf den AGT-Gehalt untersucht.

Bei allen PA- und A-Präparationen scheint in den ersten 8 h der AGT-Gehalt abzunehmen, während in den darauffolgenden Stunden diese Abnahme mehr als rekompensiert zu werden scheint. Allerdings sind diese Änderungen aufgrund sehr hoher Variabilität zwischen den einzelnen Präparationen nicht signifikant.

a)



b)

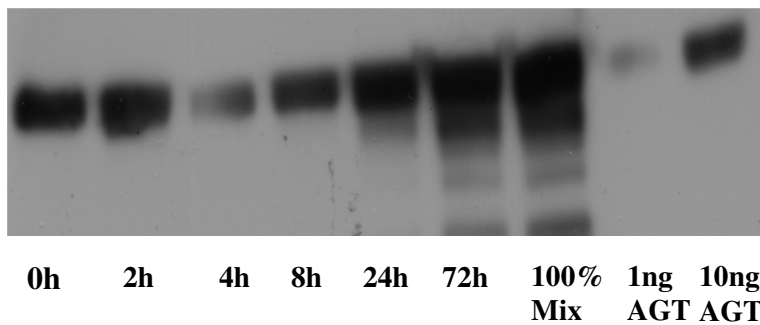


Abbildung 26: Abbau von AGT durch PA (a) und A (b), SDS-Page und immunologische Detektion mit einem primären anti-human AGT-Antikörper

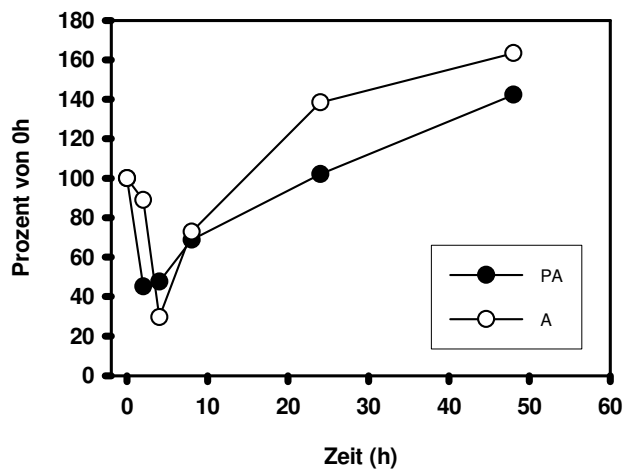


Abbildung 27: Verlauf der Konzentration extern zugegebenen AGT's zu humanen PA und A (n=3)

Zugabe von 1,5 ml 10 μ g AGT/ml SD₆-Medium zum Zeitpunkt 0 h auf 10 cm²-Schälchen PA und A 14 Tage nach Erreichen der Konfluenz. Abnahme von 100 μ l zu den angegebenen Zeitpunkten, Methanol-Chloroform-Fällung, Auftrennung durch SDS-PAGE und immunologische Detektion mit dem primären anti-human AGT-Antikörper von Dr Philip McTernan. Gezeigt sind die Mittelwerte an 3 unabhängigen Experimenten.

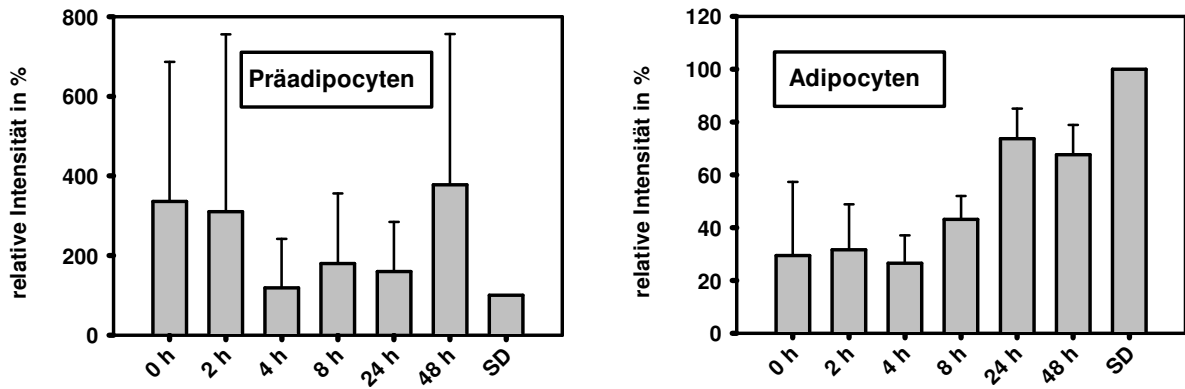


Abbildung 28: AGT-Abbau durch PA und A (n=3)

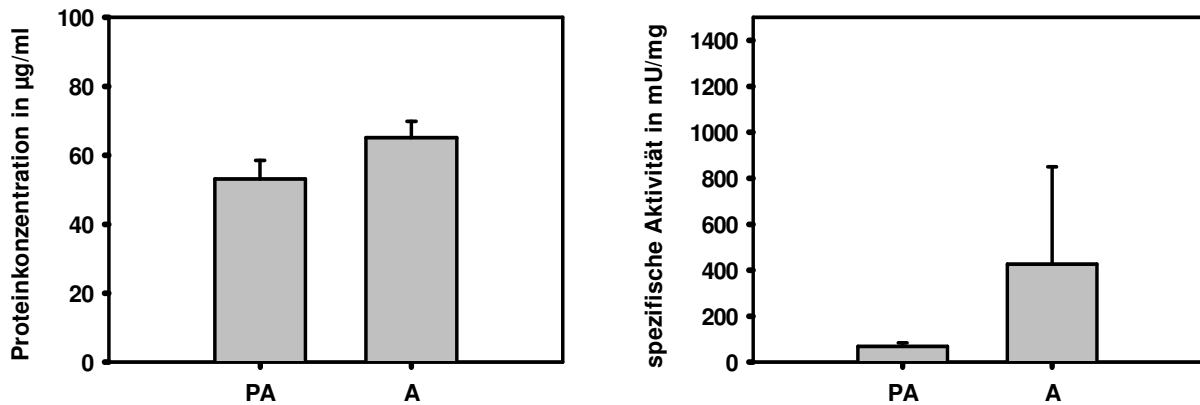


Abbildung 29: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der in den Versuchen zur Abbaukinetik von AGT verwendeten PA und A (n=3)

4.4.2 AGT-Neusynthese

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, ob bei PA und A, die in reinem SD₆-Medium gehalten wurden, AGT im Überstand nachgewiesen werden konnte. Dies würde auf eine Neusynthese schließen lassen. Hierzu wurden die Zellen wie in 3.6 beschrieben, kultiviert und zum Zeitpunkt 0 h 10 ml reines SD₆-Medium zu jeder 60 cm²-Kulturschale zugegeben. Die zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 4 h, 24 h und 48 h entnommenen Proben wurden mittels Gelelektrophorese, Western Blot und immunologischem Proteinnachweis auf das Vorhandensein von AGT untersucht.

Es konnte jedoch in keiner der Proben, weder bei den PA noch bei den A, AGT nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit ist die Entdeckung eines lokalen RAS im humanen Fettgewebe. Es scheint sowohl eine Rolle in der lokalen Fettgewebshomöostase, als auch in der systemischen Regulierung des Blutdrucks und in der Pathogenese des metabolischen Syndroms zu spielen (Engeli et al. 2005). Es konnte die Gen-Expression von Renin, AGT und ACE, alles Komponenten des systemischen RAS, im Fettgewebe nachgewiesen werden (Schling et al. 1999). Somit wurde für das lokale Fettgewebe-RAS eine ähnliche Reaktionsfolge wie im klassischen RAS, mit Bildung von Ang I und seines physiologisch aktiven Spaltproduktes Ang II aus AGT, vermutet. T. Schäfer konnte bereits zeigen, dass Ang II durch humane A und PA zwar gebildet, jedoch unter Beteiligung von Neprilysin rasch abgebaut wird (Schäfer et al. 2001). Ang II scheint nicht - wie im systemischen RAS - das physiologisch bedeutsamste Produkt des Fettgewebe-RAS zu sein: Weder Ang I noch Ang II wurden in nennenswerter Konzentration in den Zellüberständen humaner A und PA gefunden. In der vorliegenden Arbeit sollten alternative Abbauwege von AGT im Fettgewebe, die beteiligten Enzyme und die dabei entstehenden Ang-Peptide untersucht werden. Insbesondere interessierten hier die biologisch aktiven Ang-Peptide Ang-(2-8), Ang-(3-8) und Ang-(1-7).

5.1 Diskussion der verwendeten Methodik

5.1.1 Nachweis von Angiotensinen mittels HPLC

Um die einzelnen Ang-Peptide, ihre Abbaukinetiken und die dabei entstehenden neuen Fragmente untersuchen zu können, wurde ihre Auftrennung mittels HPLC mit Nachweis im angeschlossenen UV-Detektor etabliert. Hierdurch konnte eine eindeutige Identifizierung der eingesetzten Ang-Peptide ermöglicht werden. Allerdings war es nicht möglich, mit dieser Methode Ang-Fragmente nachzuweisen, die direkt aus der Hydrolyse des Ursprungsproteins AGT entstehen. Für den photometrischen Nachweis der einzelnen Ang-Spaltprodukte im UV-Detektor der HPLC sind mikromolare Testkonzentrationen nötig. AGT konnte den Zellen jedoch höchstens in nanomolarer Konzentration angeboten werden. Aus diesem Grund wurden folgende käuflich erwerbbare Ang-Peptide den Zellen direkt und in ausreichender Konzentration (1 mM) zugegeben: Ang-(1-10), -(2-10), -(1-9), -(2-8), -(3-8), -(4-8), -(5-8), (1-7), -(3-7), -(1-6), -(1-5). Biologische Aktivität ist hiervon

für die Peptide Ang-(2-8), Ang-(3-8), Ang-(1-9), Ang-(1-7), sowie indirekt für Ang-(2-10) als Vorläuferpeptid von Ang-(2-8) bekannt.

Die zur Quantifizierung verwendeten Eichgeraden wurden in SD₆-Medium ohne Zellkontakt definiert, während die Abbau- und Inhibitorkinetiken an Überständen aus Zellkulturen in beschichteten Schälchen durchgeführt wurden, an die Peptide vermutlich unspezifisch gebunden werden. Dem entspricht, dass die Wiederfindung nach Zugabe von 1 mM Ang-Peptid in den meisten Fällen zum Zeitpunkt 0 h lediglich zwischen 700 - 800 µM, bei Ang-(1-9) sogar nur 300 - 400 µM beträgt. Deshalb ist vielmehr die Tendenz der Abbau- und Synthesekinetiken der Angiotensine und deren prozentueller Verlauf zu den jeweiligen Zeitpunkten von Bedeutung als die Absolutwerte. Diese sind zudem zwischen den einzelnen Angiotensinen nur eingeschränkt miteinander zu vergleichen. Auch wenn im Ergebnisteil zur besseren Veranschaulichung das Ursprungspeptid und die Spaltprodukte im selben Graphen dargestellt sind, soll damit vor allem der Verlauf von Abbau und Neusynthese dargestellt werden.

5.1.2 Nachweis von AGT-Synthese und –Abbau mittels Western Blot

In einem Vorversuch wurden AGT-Standards (käuflisches AGT aus humanem Plasma) ohne Zellkontakt in steigender Konzentration von 0 ng bis 10 µg, wie in 3.6 beschrieben, mit Methanol gefällt und mittels Gelelektrophorese und Immunoblot untersucht. AGT konnte ab einer Stoffmenge von 1 µg immunologisch nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde in einem Vorversuch reines, unbehandeltes AGT in einer Stoffmenge von 10 ng und 100 ng aufgetragen, das ebenfalls jeweils als deutliche Bande erkennbar war. Somit scheint durch die vielen Arbeitsschritte der Methanolfällung ein großer Teil des ursprünglich vorhandenen AGT's verloren zu gehen.

In der Auswertung der durchgeführten Versuche stellte sich heraus, dass die Methode durch die vielen Arbeits- und Inkubationsschritte, die niemals vollkommen gleich ausgeführt werden können, sehr ungenau ist. Es ergaben sich hohe Standardabweichungen und auch das Verhältnis zwischen dem Standard und den 1 ng und 10 ng-Proben, die in jedem Lauf eingesetzt wurden, war teils sehr unterschiedlich. Aus diesem Grund können aus diesen Versuchen keine quantitativ signifikanten Aussagen getroffen werden. Qualitativ zeigten sich jedoch in jeder der untersuchten PA- und A-Populationen sehr ähnliche Verläufe und Tendenzen im AGT-Synthese- und Abbauverhalten. Die Entwickler des AK konnten mit seiner Hilfe bereits von humanen A produziertes AGT nachweisen, so

dass der AK die von diesen Zellen produzierte Glykosylierung zu erkennen scheint (Harte et al. 2003).

5.2 Abbau und Synthese von AGT durch humane PA und A

Beantwortet werden sollte die Frage, ob es zu einer de novo-Synthese von AGT, bzw. zur Hydrolyse von hinzugegebenem AGT durch kultivierte humane PA und A kommt. Eine AGT-Bildung und -Sekretion durch kultivierte PA und A konnte mit Hilfe des anti-humanen-AGT-AK nicht nachgewiesen werden. Gründe hierfür liegen sicher im wenig sensitiven Testsystem (siehe 5.1.2) und in den nicht völlig ausgereiften, multilokulären Adipocyten. Die Arbeitsgruppe von Phil McTernan, die mir freundlicherweise den anti-humanen-AGT-AK zur Verfügung stellte, konnte eine AGT-Sekretion bei ausdifferenzierten, unilokulären Adipocyten nachweisen (Harte et al. 2005). Allerdings wurden hier die Adipocyten selbst und nicht das Medium untersucht. Zum anderen sezernieren kultivierte PA oder in vitro differenzierte A vermutlich keine ausreichenden Mengen an freiem AGT: In den Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass AGT erst ab einer Konzentration von $1\text{ }\mu\text{g}/800\text{ }\mu\text{l}$ nachgewiesen werden konnte. Es wurden 10 ml Medium auf 60 cm^2 Zellrasen gegeben und hiervon $800\text{ }\mu\text{l}$ abpipettiert. Um die zur Detektion erforderliche Menge von $1\text{ }\mu\text{g}$ AGT zu erreichen, hätten die Zellen über $200\text{ ng AGT}/\text{cm}^2$ Zellrasen sezernieren müssen. Bei einer geschätzten Zelldichte von $0,25 \times 10^6$ Zellen/ cm^2 im konfluenten Zustand entspricht dies einer Menge von $830\text{ ng AGT}/10^6$ Zellen. Prat-Larquemin et al. konnten 2004 erstmals eine quantitative AGT-Sekretion durch humane subkutane Adipocyten zeigen. Es stellten sich jedoch große interindividuelle Unterschiede der sezernierten Menge an AGT dar, die von $140\text{ ng} - 2575\text{ ng AGT}/10^6$ Zellen/24 h reichte (Prat-Larquemin et al. 2004). Diese Mengen liegen teilweise deutlich unter der bei mir erforderlichen Menge von 830 ng AGT . Darüber hinaus wurden von mir die ersten untersuchten Proben bereits zum Zeitpunkt 2 h, 4 h und 8 h abpipettiert, so dass hier vermutlich die für die Bildung erforderliche Zeit nicht gegeben war.

Die initiale Abnahme des hinzugegebenen AGT's zu kultivierten PA und A kann durch Absättigung von Bindungsstellen auf den Schälchen und Zellen, durch Hydrolyse oder Internalisierung des Proteins in die Zellen erfolgen. Hierzu müssten in einem weiteren Schritt die Zelllysate untersucht werden. Nach initialer Abnahme kam es während des weiteren Versuchsablaufes wieder zu einer Zunahme der AGT-Menge, die die

ursprünglich erfolgte Abnahme mehr als kompensierte. Die Bindung an die Schälchen und Zellen sollte sich nach Erreichen einer Plateau-Phase nicht mehr ändern, so dass die Zunahme durch die Adipocyten bedingt scheint. Ob AGT durch die Zellen neu gebildet und frei gesetzt wird, oder ob sich durch den Zellkontakt die Glykosylierung von AGT und damit die Affinität zu seinem AK ändert, ist aus meinen Ergebnissen jedoch nicht zu ersehen.

5.3 Abbau und Synthese der einzelnen Angiotensine

5.3.1 Allgemeines

Im klassischen RAS ist Ang II das wichtigste Syntheseprodukt des Ang I-Abbaus und hauptverantwortlich für die systemischen Effekte dieses Hormonsystems, u. a. die Blutdrucksteigerung, die Freisetzung von Aldosteron oder das Zellwachstum. Im Fettgewebe und in Zellkulturüberständen humaner PA und A konnten jedoch weder Ang-(1-10) noch Ang II in physiologisch ausreichender Konzentration nachgewiesen werden (Schling et al. 1999; Prat-Larquemin et al. 2004). Darüber hinaus wird das gebildete Ang II durch das Enzym Neprilysin, das vor allem auf A in großer Menge exprimiert wird, rasch neutralisiert (Schling et al. 2002). Somit scheint Ang II im lokalen RAS des Fettgewebes nicht das physiologisch bedeutsamste Peptid zu sein. Sowohl PA wie auch A exprimieren AT₁- und AT₂-Rezeptoren, während der adipogenen Konversion scheint sich das Verhältnis von AT₁-Rezeptoren zu AT₂-Rezeptoren zu verschieben (Schling 2002). So liegt die Vermutung nahe, dass auch die Effekte des Fettgewebe-RAS über die klassischen RAS-Rezeptoren vermittelt werden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, vermitteln neben Ang II auch weitere Ang-Peptide ihre Effekte über die klassischen Ang-Rezeptoren. Insbesondere für Ang-(1-7), Ang-(3-8) und Ang-(4-8) ist eine unterschiedlich hohe Affinität für den AT₁-Rezeptor bekannt.

Bereits vor Jahren stellten sich zwei Reaktionswege des RAS mit gegensätzlicher physiologischer Wirkung dar: Zum einen der klassische Weg mit Bildung des hypertensiv wirkenden Ang II, zum anderen die Entstehung von Ang-(1-7) ebenfalls aus Ang-(1-10), das vasodilatatorische und blutdrucksenkende Effekte ausübt. Im subkutanen Fettgewebe des Menschen herrscht offensichtlich der Reaktionsweg über Bildung von Ang-(1-7) vor.

Abbildung 30 stellt das aus den Abbau- und Inhibitionsversuchen abgeleitete Reaktionsschema des lokalen RAS des Fettgewebes mitsamt den vermutlich beteiligten Enzymen dar:

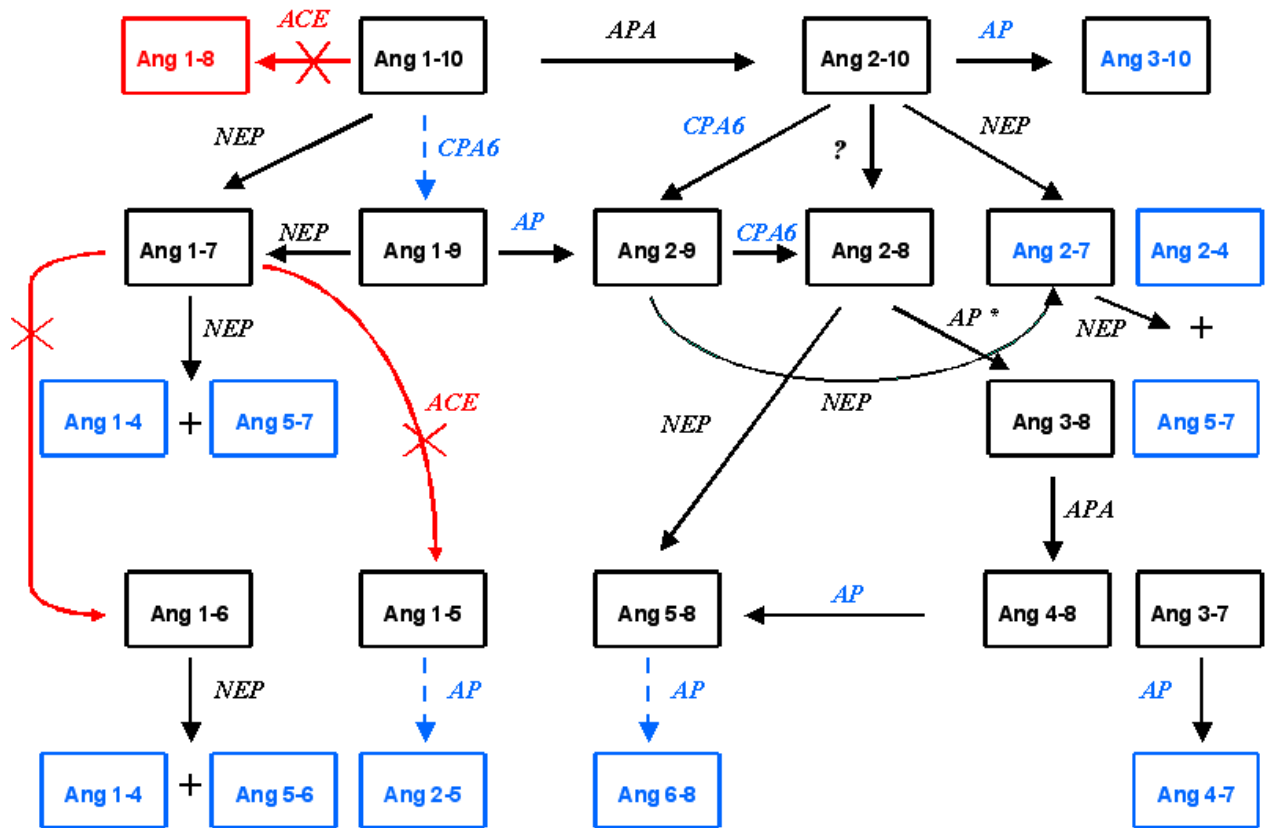


Abbildung 30: Aus den Versuchen abgeleitetes Reaktionsschema des lokalen Fettgewebe-RAS mit den beteiligten Enzymen

→ Abbauweg nicht zu beobachten; **blau** Abbauweg bzw. entstehende Peptide spekulativ;
APA Aminopeptidase, die von Amastatin, nicht jedoch Bestatin inhibiert wird, möglicherweise Aminopeptidase A; *AP** Aminopeptidase, die weder von Amastatin, noch von Bestatin inhibiert wird; *ACE* Angiotensin Converting Enzym, *CPA6* Carboxypeptidase, möglicherweise CPA6; *NEP* Neprilysin

AGT und die längeren Peptide Ang-(1-14) und Ang-(1-13) konnten nicht, bzw. nur sehr unzuverlässig mittels HPLC dargestellt werden. Auch konnten während ihres Abbaus keine weiteren kürzeren Ang-Peptide, insbesondere kein Ang-(1-10), nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Ergebnisse einer Studie von Prat-Larquemin et al. aus dem Jahr 2004, die in Zellüberständen humaner subkutaner Adipocyten ebenfalls kein Ang-(1-10) fanden (Prat-Larquemin et al. 2004). Somit stellen die PA und A Ang-(1-10) vermutlich nicht selbst mit Hilfe von Renin aus AGT her. Das Fettgewebe-RAS scheint

vielmehr auf die Anlieferung des Substrates Ang-(1-10) mit dem Blutplasma angewiesen zu sein oder dessen Bildung erfolgt in anderen Zelltypen des Fettgewebes.

Als weiterer wesentlicher Unterschied zum systemischen RAS wandelten die humanen PA und A Ang-(1-10) nicht in Ang II um. Dieses Peptid, das im klassischen RAS für die meisten systemischen Effekte verantwortlich ist, konnte in keiner der untersuchten Abbaukinetiken nachgewiesen werden. Aus Ang-(1-10) bilden PA und A mittels Neprilysin das ebenfalls physiologisch aktive Ang-(1-7) als zentrales und relativ stabiles Ang-Peptid des Fettgewebe-RAS. Auch nach Inhibition von Neprilysin konnte kein Ang II nachgewiesen werden, so dass eine Beteiligung von ACE am Ang-(1-10)-Abbau unwahrscheinlich erscheint. Nach Neprilysin-Inhibition kam es jedoch zu einer vermehrten Bildung von Ang-(2-10), so dass ein weiteres Enzym, vermutlich APA, am Ang-(1-10)-Abbau beteiligt ist. Nach Thiorphan-Zugabe kam es zu einer Akkumulation von Ang-(1-7), so dass Neprilysin auch an seiner Hydrolyse beteiligt zu sein scheint. Die dabei entstehenden Spaltprodukte (vermutlich Ang-(1-4) und -(5-7)) waren jedoch offensichtlich zu kurz um in der HPLC detektiert zu werden. Aus dem Spaltprodukt Ang-(1-9) entstand durch Neprilysin ebenfalls Ang-(1-7). Möglicherweise kommt es durch Wirkung einer Aminopeptidase auch zur Bildung von Ang-(2-9), das aufgrund der vermuteten identischen Retentionszeiten jedoch nicht nachgewiesen werden könnte. Das aus Ang-(1-10) entstehende Spaltprodukt Ang-(2-10) wird seinerseits durch eine Carboxypeptidase zu Ang-(2-9) und eine Endopeptidase zu Ang-(2-8) abgebaut. Darüber hinaus entstehen zwei weitere Spaltprodukte, bei denen es sich möglicherweise um die Peptide Ang-(3-10) und Ang-(2-7) handelt. Der weitere Abbau von Ang-(2-8) erfolgt durch die Beteiligung einer oder mehrerer Peptidasen, u. a. APA und Neprilysin, zu den Spaltprodukten Ang-(3-8), -(4-8), -(5-8) und -(6-8). Im Folgenden werden die einzelnen Abbauschritte im Detail erläutert.

5.3.2 Diskussion der einzelnen Abbauwege

Ang-(1-10) zu Ang-(1-7)

Das Fettgewebe-RAS unterscheidet sich wesentlich vom systemischen RAS. Bei der Hydrolyse von Ang-(1-10) durch PA und A konnte Ang II nicht nachgewiesen werden. Dagegen entstand Ang-(1-7) als zentrales Spaltprodukt aus Ang-(1-10). Seine Akkumulation bei PA und A spricht für seine biologische Bedeutung. ACE, das zentrale Enzym des klassischen RAS scheint somit im Fettgewebe-RAS nicht aktiv zu sein.

Da ich vermutete, Neprilysin könnte an der Hydrolyse von Ang-(1-10) und Ang-(1-9) beteiligt sein, setzte ich in den jeweiligen Inhibitionskinetiken den Metalloprotease-Inhibitor Thiorphan ein, der als der derzeit spezifischste Inhibitor dieses Enzyms gilt. Neprilysin greift Peptide bevorzugt an der aminoterminalen Seite hydrophober AS wie Phe, Leu, Ile und Met an (Erdös et al. 1989). Zu seinen Substraten gehört auch Ang II, wie in in vivo- und in vitro-Studien bewiesen werden konnte (Allred et al. 2000; Erdös et al. 1989). Im Fettgewebe spaltet es Ang II vor der AS Ile in die Fragmente Ang-(1-4) und Ang-(5-8) (Schling et al. 2002). Neprilysin wird im Verlauf der adipogenen Konversion vermehrt exprimiert (Schling et al. 2002), was seine Beteiligung an den Abbauvorgängen, die durch A deutlich rascher ablaufen als durch PA, nahe legt. Die Hydrolyse von Ang-(1-10) und Ang-(1-9) zu Ang-(1-7) erfolgt vor der AS Phe und verläuft bei den A schneller als bei den PA, womit eine Beteiligung von Neprilysin möglich erscheint. Die signifikante Verringerung des Abbaus von Ang-(1-10) und Ang-(1-9) sowie der Neusynthese von Ang-(1-7) nach Zugabe von 100 µM Thiorphan zu PA und A scheinen eine Beteiligung von Neprilysin zu bestätigen. Entsprechend der insgesamt schnelleren Umsetzung der Peptide durch die A ist auch die Inhibition hier eindeutiger. Allerdings verlief die Inhibition weder bei PA noch bei A vollständig. Vor allem bei den A scheint Thiorphan nach 48 h seine Wirksamkeit verloren zu haben. Abhängig vom Gewebetyp wurden bisher mindestens drei verschiedene Enzyme identifiziert, die am Abbau von Ang-(1-10) zu Ang-(1-7) beteiligt sind. In der Zirkulation (Allred et al. 2000) und im Herzgewebe (Jackman et al. 2002) ist Neprilysin das entscheidende Enzym, in neuronalem und vaskulärem Gewebe dagegen die beiden Endopeptidasen Thimet-Oligopeptidase und Prolyl-Endopeptidase (Allred et al. 2000).

Ang-(1-10) zu Ang-(2-10)

Ein weiteres Produkt des Ang-(1-10)-Abbaus ist Ang-(2-10). Es trat - in kleinen Mengen und mit kurzer HWZ - regelmäßig beim Abbau durch die nicht inhibierten PA auf. Dagegen konnte Ang-(2-10) in Abwesenheit von Thiorphan lediglich in einer der untersuchten A-Populationen nachgewiesen werden. Möglicherweise entsteht es hier in geringerer Menge durch die raschere Umsetzung von Ang-(1-10) zu Ang-(1-7) durch Neprilysin oder es wird seinerseits schneller wieder abgebaut. Genauere Aussagen sind aufgrund der sehr inhomogenen Entstehung bei PA und A nicht möglich. Nach Thiorphan-Zugabe nimmt die Menge des gebildeten Ang-(2-10) sowohl bei PA als auch bei A zu. Diese Beobachtungen legen die Beteiligung einer Aminopeptidase nahe, die die

N-terminale AS Asp von Ang-(1-10) abspaltet und so zur Entstehung von Ang-(2-10) führt. Dieses Enzym spielt bei den nicht inhibierten Kontrollgruppen nur eine untergeordnete Rolle und tritt erst nach Inhibition von Neprilysin in Erscheinung. Womöglich handelt es sich hierbei um die Aminopeptidase A, die bevorzugt an Peptide mit den AS Asparaginsäure und Glutaminsäure an N-terminaler Stelle bindet. Über ein Vorkommen dieser Aminopeptidase im Fettgewebe ist bisher nur wenig bekannt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aminopeptidase A z. B. im Gehirn und in glatten Muskelzellen zur Entstehung von Ang-(2-8) aus Ang II durch Abspaltung der AS Asp führt (Zini et al. 1996; Mentlein et al. 1996). Die Beteiligung anderer Aminopeptidasen des RAS wie Aminopeptidase B, Aminopeptidase N oder Leucin-Aminopeptidase ist durch die N-terminale Stellung von Asp bei Ang-(1-10) eher unwahrscheinlich. Die Akkumulation von Ang-(2-10) nach Neprilysin-Hemmung spricht auch für eine Beteiligung von Neprilysin am Ang-(2-10)-Abbau. Näheres hierzu wird im Abschnitt Ang-(2-10) zu Ang-(2-7) ausgeführt.

Ang-(1-9) zu Ang-(1-7), Ang-(1-9) zu Ang-(2-9)

Der Abbau von Ang-(1-9) verläuft ähnlich dem von Ang-(1-10) mit Entstehung von Ang-(1-7) durch Neprilysin. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch bei der Hydrolyse von Ang-(1-9) durch Abspaltung der aminoterminalen AS das Peptid Ang-(2-9) entsteht. Dieses Peptid stand nicht als käufliches Angiotensin zur Verfügung und konnte somit nicht in den Vorversuchen auf seine Retentionszeit untersucht werden. Da beim Abbau von Ang-(2-10) ein Spaltprodukt mit der Retentionszeit von Ang-(1-9) entstand, vermutete ich, es könnte sich um das Spaltprodukt Ang-(2-9) handeln. Eine eindeutige Identifizierung war jedoch nicht möglich. Sollte Ang-(2-9) bei der Hydrolyse von Ang-(1-9) entstehen, würde es aufgrund der vermuteten identischen Retentionszeiten nicht als eigener Peak dargestellt werden. Vielmehr würde es zu einer verzögerten Abnahme des Ang-(1-9)-Peaks kommen. Weitere Spaltprodukte konnten während des Abbaus nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise trägt hierzu jedoch auch die schlechte Wiederfindungsrate des Peptids (ca. 40 %) bei, wodurch Abbauprodukte möglicherweise in zu geringer, nicht detektierbarer Konzentration auftreten.

Ang-(1-7) zu Ang-(1-4) und Ang-(5-7)

Ang-(1-7) entsteht durch Neprilysin als zentrales Produkt des Ang-(1-10)- und Ang-(1-9)-Abbaus. Auch die weitere Hydrolyse von Ang-(1-7) scheint durch Neprilysin in die kurzen

Peptide Ang-(1-4) und Ang-(5-7) zu erfolgen. Hierfür sprechen mehrere Tatsachen: Nach Neprilysin-Inhibition kommt es zu einer Akkumulation von Ang-(1-7) nach seiner Entstehung aus Ang-(1-10). Zudem ist die Abbau-Geschwindigkeit stark vom Differenzierungsgrad der PA und A abhängig (siehe Abbildung 17). Dies spricht für die Wirkung eines Enzyms, dass auf den A deutlich stärker exprimiert wird, wie es für Neprilysin der Fall ist. Auch konnten während der Hydrolyse von Ang-(1-7) keine weiteren Spaltprodukte detektiert werden, was für die Entstehung sehr kurzer Peptide spricht, die bei der gewählten HPLC-Methode nicht ausreichend lang mit der stationären Phase wechselwirken. Möglicherweise verläuft die Hydrolyse der Spaltprodukte auch wesentlich schneller als deren Bildung. Der vermutete Abbauweg von Ang-(1-7) durch Neprilysin über die Entstehung von Ang-(1-4) und Ang-(5-7) konnte in der Niere bereits nachgewiesen werden (Allred et al. 2000). Im Fettgewebe wird Ang II durch Neprilysin vor der AS Ile in die Fragmente Ang-(1-4) und Ang-(5-8) gespalten (Schling et al. 2002). Ein paralleler Abbauweg von Ang-(1-7) im Fettgewebe ist naheliegend. Der Abbau vom carboxyterminalen Ende mit Entstehung des Peptids Ang-(1-6) wird durch die C-terminale Prolyl-Bindung deutlich erschwert. Bisher wurde noch keine Carboxypeptidase gefunden, die das C-terminale Prolin abspalten könnte. Somit sind die Ang-Peptide durch die C-terminale Stellung von Prolin ab der 7. Position vor Hydrolyse durch eine Carboxypeptidase geschützt. Auch der in der Zirkulation (Chappell et al. 2001) und im Lungengewebe (Chappell et al. 1998) vorherrschende Abbau durch ACE zu Ang-(1-5) konnte ausgeschlossen werden, da ACE im Fettgewebe-RAS offensichtlich keine ausreichende Aktivität aufweist. Darüber hinaus hätten die in den oben beschriebenen Abbauwegen entstehenden Peptide Ang-(1-6) und Ang-(1-5) mittels HPLC durch einen eindeutigen Peak dargestellt werden müssen. Nicht ausgeschlossen werden kann die Abspaltung des aminoterminalen Dipeptids Asp-Arg durch eine Dipeptidylpeptidase. Das so entstandene Fragment Ang-(3-7) könnte aufgrund der identischen Retentionszeit nicht von Ang-(1-7) unterschieden werden. In diesem Fall wäre die Stabilität von Ang-(1-7) im Vergleich zu anderen Peptiden ähnlicher Länge auch durch das Anfallen des Spaltproduktes erklärt.

Interessanterweise konnte für Ang-(1-7) in verschiedenen Geweben eine zu Ang II antagonistische Wirkung festgestellt werden: Im ZNS (Campagnole-Santos et al. 1992), in der Niere (Hilchey et al. 1995) und im Gefäßsystem (Santos et al. 2000) wirkt Ang-(1-7) durch vasodilatatorische Effekte und Förderung von Diurese und Natriurese blutdrucksenkend. Darüber hinaus besteht für Ang-(1-7) im Gegensatz zu Ang II eine

antiproliferative und antiangiogene Wirkung (Freeman et al. 1996). Diese Effekte werden in den oben genannten Organen zum einen über AT₁- und AT₂-Rezeptoren vermittelt, zum anderen wird die Beteiligung eines noch nicht identifizierten spezifischen Rezeptors diskutiert. Santos et al. konnten 2003 in renalem und aortalem Gewebe von Mäusen erstmals einen eigenen Ang-(1-7)-Rezeptor, einen Onkogen-Rezeptor, identifizieren (Santos et al. 2003). Sollte das in den PA und A synthetisierte Ang-(1-7) systemisch wirken und diese Effekte ebenfalls vornehmlich vasodilatatorisch und blutdrucksenkend sein, würde dies der Theorie widersprechen, das lokale Fettgewebe-RAS trage zur Pathogenese des metabolischen Syndroms bei. Vielmehr würde dann dem Fettgewebe-RAS eine protektive systemische Funktion zukommen. Allerdings wurde in meinen Versuchen nur mit subcutanen Präadipocyten und Adipocyten gearbeitet. Die Pathogenese der Adipositas-assoziierten Erkrankungen Hypertonus und Diabetes mellitus ist jedoch von der Menge an visceralem Fettgewebe abhängig. Möglicherweise haben subcutane und viszerale Adipocyten einen unterschiedlichen Reaktionsverlauf ihres lokalen RAS. Hierzu müssten vergleichende Versuche beider Fettgewebsarten durchgeführt werden.

Ang-(2-10) zu Ang-(2-8), Ang-(2-10) zu Ang-(2-9), Ang-(2-9) zu Ang-(2-8)

Ang-(2-10), das zweite Spaltprodukt der Ang-(1-10)-Hydrolyse durch PA und A wurde in insgesamt vier neue Peptide gespalten. Eindeutig identifiziert werden konnte hiervon jedoch nur Ang-(2-8). Bei einem weiteren Spaltprodukt handelt es sich aufgrund der identischen Retentionszeiten mit Ang-(1-9) vermutlich um das Fragment Ang-(2-9) (siehe auch 4.2.3), das durch Abspaltung der carboxyterminalen AS Leu aus Ang-(2-10) entstehen würde. ACE scheint im lokalen Fettgewebe-RAS nicht aktiv zu sein, da sowohl die Bildung von Ang II aus Ang-(1-10), als auch die Entstehung von Ang-(1-5) aus Ang-(1-7) unterbleibt (siehe Abschnitt zu Ang-(1-7) zu Ang-(1-4) und Ang-(5-7)). Somit ist auch eine - theoretisch mögliche - Beteiligung von ACE an der Umwandlung von Ang-(2-10) zu Ang-(2-8) unwahrscheinlich. Die Frage, ob Ang-(2-9) und Ang-(2-8) gleichzeitig aus Ang-(2-10) entstehen, oder ob Ang-(2-9) durch Abspaltung der carboxyterminalen AS His rasch zu Ang-(2-8) abgebaut wird, sollte durch die Zugabe des Carboxypeptidase-Inhibitors PCI geklärt werden. In letzterem Fall würde sich die Hydrolyse von Ang-(2-9) jedoch von der des verwandten Ang-(1-9) unterscheiden, das durch Abspaltung des carboxyterminalen Dipeptids Phe-His zu dem biologisch aktiven Ang-(1-7) abgebaut wird. 2008 wurde von Lyons et al. erstmals die Carboxypeptidase A (CPA6) beschrieben, die im zentralen Nervensystem Ang-(2-10) über Ang-(2-9) zu

Ang-(2-8) spaltet (Lyons et al. 2008). Über ein Vorkommen im Fettgewebe ist bisher noch nichts bekannt. Hass et al. konnten 1981 nachweisen, dass PCI die Carboxypeptidasen A und B, nicht jedoch ACE und die intrazellulären Carboxypeptidasen P und N hemmt (Hass et al. 1981). Insbesondere wird auch CPA6 durch PCI inhibiert (Lyons et al. 2008).

Die vollständige Inhibition der Entstehung von Ang-(2-9) nach PCI-Zugabe macht eine Beteiligung der CPA6 an diesem Reaktionsschritt möglich. Allerdings wurde die Bildung von Ang-(2-8) durch PCI eher gefördert. Dies weist auf eine parallele Entstehung von Ang-(2-8) und Ang-(2-9) aus Ang-(2-10) durch die Aktivität zweier verschiedener Enzyme hin. Hierbei handelt es sich zum einen um eine Carboxypeptidase, die die C-terminale AS Leucin abspaltet und zur Entstehung von Ang-(2-9) führt, möglicherweise CPA6. Desweiteren ist eine Endopeptidase (Dicarboxypeptidase) beteiligt, die zwischen den AS Phenylalanin und Histidin spaltet, wodurch Ang-(2-8) entsteht. Beide Enzyme scheinen das Peptid gleichzeitig anzugreifen und darum zu konkurrieren. Durch den Inhibitor PCI wird jedoch nur die Carboxypeptidase inhibiert. Der Abbau durch die Dicarboxypeptidase verläuft daraufhin insgesamt schneller. Im Gegensatz zu den PA wird die Ang-(2-9)-Bildung bei den A durch PCI nicht vollständig unterdrückt, die beteiligte Carboxypeptidase scheint also noch eine Restwirkung zu haben. Es könnte sich hierbei um eine unvollständige Inhibition handeln, die erst bei niedrigerer Enzymkonzentration, wie sie vermutlich bei den PA vorliegt, vollständig ablaufen kann. Zudem werden vermutlich, wie bereits bei Nephilysin der Fall (Schäfer et al. 2001), auch die am Abbau von Ang-(2-10) beteiligten Enzyme bei den A vermehrt exprimiert, wodurch die verstärkte Wirkung der Carboxypeptidase erklärt werden könnte. Möglicherweise ist auch eine zweite Carboxypeptidase beteiligt, die nicht durch PCI inhibiert wird.

Die Abbauwege von Ang-(2-10) im lokalen Fettgewebe-RAS scheinen sich vom systemischen RAS zu unterscheiden. In verschiedenen Studien konnte in der Zirkulation der Abbau von Ang-(2-10) zu Ang-(2-8) durch ACE sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen nachgewiesen werden (Vaughan et al. 1977; Kono et al. 1980; Lim et al. 1998). In keiner der genannten Studien ist jedoch die Beteiligung eines weiteren Enzyms, insbesondere einer Carboxypeptidase, am Ang-(2-10)-Abbau erwähnt. Dies scheint eine Besonderheit des humanen Fettgewebe-RAS zu sein.

Ang-(2-10) zu Ang-(3-10), Ang-(2-10) zu Ang-(2-7)

Bei den beiden nicht zu identifizierenden Spaltprodukten von Ang-(2-10) handelt es sich vermutlich um die Peptide Ang-(3-10) (Retentionszeit 40 min) und Ang-(2-7) (Retentionszeit 8 min). Das Spaltprodukt mit einer Retentionszeit von 40 min erscheint nur bei der Ang-(2-10)-Hydrolyse und scheint somit relativ lang zu sein. Zudem liegt seine Retentionszeit in der Nähe derer von Ang-(1-10), Ang-(2-10) und Ang-(3-8) (siehe Tabelle 5). Die zunehmende Länge der Peptide sowie die freie 3er-Position (Valin) scheinen zu einem längeren Verweilen an der Säule zu führen. Durch die Umsetzung von Ang-(2-8) zu Ang-(3-8) (siehe Abschnitt Ang-(2-8) zu Ang-(3-8)) konnte bereits nachgewiesen werden, dass die hierzu erforderliche Amino-peptidase auf PA und A exprimiert wird. Darüber hinaus erscheint das Spaltprodukt bei 40 min parallel zu Ang-(2-9) und Ang-(2-8), ist also offensichtlich kein Abbauprodukt dieser Peptide. Durch Zugabe von PCI wird es stabilisiert, so dass es vermutlich denselben C-Terminus wie das verwandte Ang-(2-10) aufweist. Ein Abbau durch eine Dicarboxypeptidase analog dem Abbau von Ang-(2-10) zu Ang-(2-8) scheint hier jedoch nicht statt zu finden.

Bei dem 2. Spaltprodukt mit einer Retentionszeit von 8 min könnte es sich um das Peptid Ang-(2-7) handeln, das durch Neprilysin aus Ang-(2-10) entsteht. Für eine Beteiligung von Neprilysin am Ang-(2-10)-Abbau spricht die Tatsache, dass Ang-(2-10) während der Inhibitor-kinetiken von Ang-(1-10) nach Neprilysin-Hemmung akkumuliert. Allerdings ist keine – für Neprilysin typische – deutlichere Bildung bei den Adipocyten zu beobachten. Hierfür könnte die hohe Amino-peptidase-Aktivität auf den A verantwortlich sein (siehe oben), die mit Neprilysin konkurriert. Auch ein Abbau von Ang-(2-9) zu Ang-(2-7) durch Neprilysin erscheint möglich, da ein ähnliches Verhalten der beiden verwandten Peptide Ang-(1-9) und Ang-(2-9) nahe liegt. Dies ist allerdings spekulativ, da die Bildung von Ang-(2-9) nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte. Für Ang-(2-7) spricht auch, dass das Peptid nur sehr kurz auf der Säule verweilt. Peptide mit freier 2er oder 4er-AS scheinen deutlich kürzer mit der stationären Phase wechsel zu wirken, als die Peptide mit freier 3er Position. Die Peptide Ang-(2-8) und Ang-(4-8) erscheinen bei 26 min, Ang-(3-8) erst nach 35 min. Der weitere Abbau von Ang-(2-7) könnte ähnlich wie der des verwandten Ang-(1-7) durch Neprilysin über die Entstehung der Peptide Ang-(2-4) und Ang-(5-7) erfolgen.

Ang-(2-8) zu Ang-(3-8), Ang-(3-8) zu Ang-(4-8), Ang-(4-8) zu Ang-(5-8)

Die Hydrolyse von Ang-(2-8) vom carboxyterminalen Ende wird vermutlich durch die AS Prolin an 7. Position verhindert (siehe auch Abschnitt Ang-(1-7) zu Ang-(1-4) und Ang-(5-7)). Offensichtlich ist auf den PA und A keine Pro-Xaa-Carboxypeptidase (z. B. Angiotensinase C) exprimiert, die die C-terminale AS Phe von Pro abspalten würde. Die biologisch aktiven Ang-(2-8) und Ang-(3-8) werden daher von PA und A durch schrittweises Abspalten der N-terminalen AS Arg, Val und Tyr durch eine oder mehrere Aminopeptidasen bzw. Endopeptidasen abgebaut. Die dabei gebildeten Spaltprodukte Ang-(3-8), Ang-(4-8) und Ang-(5-8) entstehen teilweise parallel und weisen eine ähnliche Kinetik auf, so dass die Vermutung nahe liegt, dass Ang-(2-8) und Ang-(3-8) von mindestens zwei Peptidasen an mehreren Stellen gleichzeitig angegriffen werden. Aminopeptidasen, die eine Rolle im Angiotensin-Stoffwechsel spielen, sind die Aminopeptidase A, Aminopeptidase N, Aminopeptidase B und Leucin-Aminopeptidase (IRAP) (zu ihrer Funktion und Vorkommen siehe 1.5.1). Von diesen Aminopeptidasen wurden allerdings bisher lediglich die Leucin-Aminopeptidase (IRAP) und die Aminopeptidase N im Fettgewebe nachgewiesen. Von den beiden eingesetzten Aminopeptidase-Inhibitoren Amastatin und Bestatin, die sich in ihrem Hemm-Spektrum leicht unterscheiden (siehe 1.5.4), zeigte jedoch nur Amastatin deutlichen Einfluss auf Hydrolyse- oder Syntheseverhalten von PA und A durch Hemmung der Entstehung von Ang-(4-8) und der Hydrolyse von Ang-(5-8). Es wurde davon ausgegangen, dass beide Inhibitoren eine ähnliche Hemmkonzentration haben. Von den am Ang-Stoffwechsel beteiligten Aminopeptidasen werden die Aminopeptidase B, Aminopeptidase N und die Leucin-Aminopeptidase von Bestatin inhibiert und scheiden somit aller Wahrscheinlichkeit nach als abbauendes Enzym aus. Lediglich die Aminopeptidase A wird nur von Amastatin, nicht jedoch von Bestatin inhibiert. Somit liegt die Vermutung nahe, dass diese Aminopeptidase zumindest am Ang-(3-8)-Abbau beteiligt ist. Allerdings bindet dieses Enzym bevorzugt an Peptide mit den sauren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure an N-terminaler Stelle, wie es z. B. bei den Ang-Fragmenten Ang-(1-10), Ang II -(1-9) und -(1-7) der Fall ist. Für diese Peptide konnte jedoch kein Abbau vom aminoterminalen Ende nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Ang-(3-8) wurde die Hydrolyse von Ang-(2-8) sowie die Synthese des Spaltproduktes Ang-(3-8) auch durch den Inhibitor Amastatin nicht wesentlich beeinflusst. Dies macht eine Beteiligung der oben genannten Aminopeptidasen am Ang-(2-8)-Abbau im Fettgewebe eher unwahrscheinlich.

Hier scheint eine Aminopeptidase beteiligt zu sein, die weder von Amastatin, noch von Bestatin inhibiert wird, sowie Neprilysin (siehe Abschnitt Ang-(2-8) zu Ang-(5-8)).

Im ZNS (Zini et al. 1996) und in der glatten Gefäßmuskulatur (Mentlein et al. 1996) von Ratten konnte bisher der Abbau von Ang II zu Ang-(2-8) durch die Aminopeptidase A und die weitere Hydrolyse über die Entstehung der Peptide Ang-(3-8) und Ang-(4-8) durch die Aminopeptidase N nachgewiesen werden. Auch konnte in den glatten Gefäßmuskelzellen die Entstehung von Ang-(2-8), Ang-(3-8), und -(4-8) aus Ang II durch Amastatin und Bestatin verhindert werden (Mentlein et al. 1996). Offensichtlich unterscheidet sich hier das Hydrolyseverhalten in den verschiedenen Geweben.

Ang-(3-8) erweist sich von den Ang-(2-8) -Abbauprodukten mit einer durchschnittlichen HWZ von 10 Stunden (PA), bzw. 6 Stunden (A) als am stabilsten und übt deshalb möglicherweise eine biologische Funktion im Fettgewebe aus. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da eine Verbindung zum Glucosestoffwechsel der A bestehen könnte. Der spezifische Ang-(3-8)-Rezeptor ist identisch mit der Insulin-regulierten Aminopeptidase (IRAP) (Albiston et al. 2001), die in den Insulin-sensitiven Adipocyten und Skelettmuskelzellen zusammen mit dem Glucosetransporter GLUT₄ in intracellulären Vesikeln vorliegt (Ross et al. 1996) (Details siehe 1.3.5). Ang-(3-8) wirkt unter anderem im Fettgewebe als Inhibitor der IRAP und könnte somit eine eventuell unerwünschte katalytische Wirkung des Enzyms verhindern (Herbst et al. 1997). Im Rahmen des metabolischen Syndroms wäre hier ein funktioneller Zusammenhang zwischen Komponenten des lokalen Fettgewebe-RAS und einer Störung des Glukose-Stoffwechsels durchaus denkbar.

Ang-(2-8) zu Ang-(5-8), Ang-(5-8) zu Ang-(6-8)

Die Tatsache, dass Ang-(5-8) trotz Inhibition der Ang-(4-8)-Synthese aus Ang-(2-8) entsteht, spricht für die parallele Entstehung beider Peptide und die Beteiligung einer weiteren Peptidase am Ang-(3-8)-Abbau. Vermutlich handelt es sich hier um Neprilysin, die das Peptid zwischen den Aminosäuren Tyr und Ile angreift. Dies würde dem Abbau von Ang II in Ang-(1-4) und Ang-(5-8) durch Neprilysin entsprechen. Auch die deutlich schnellere Bildung von Ang-(5-8) durch die A spricht für die Beteiligung von Neprilysin. Nach Zugabe von Amastatin wird die Bildung von Ang-(5-8) nicht inhibiert, was für ein direktes Entstehen aus Ang-(2-8) und gegen die Abspaltung aus Ang-(3-8) durch die Aktivität einer Aminopeptidase spricht.

Während des Abbaus von Ang-(2-8) entsteht bei den A ein weiteres Fragment mit einer Retentionszeit von 8 min. Allerdings tritt es nur bei den nicht durch Amastatin inhibierten A auf, was für seine Entstehung durch eine Aminopeptidase spricht. Hier könnte es sich um das Spaltprodukt Ang-(6-8) handeln, das durch Abspalten der aminoterminalen AS aus Ang-(5-8) entsteht. Da Ang-(5-8) selbst 15 min auf der HPLC-Säule verweilt, könnte das kurze Peptid Ang-(6-8) nach 8 min noch zu detektieren sein. Ohne Zugabe von Amastatin ist das aus Ang-(2-8) entstehende Ang-(5-8) sehr instabil und wird rasch in Ang-(6-8) abgebaut. Nach Zugabe von Amastatin unterbleibt dieser Abbau und Ang-(5-8) kann akkumulieren. Verantwortlich könnte die Leucin-AP sein, die bereits in Adipocyten nachgewiesen wurde, durch Amastatin gehemmt wird und die AS Ile gut abspalten kann (Hattori et al. 1999; Wilkes et al. 1985; Müller et al. 1982).

Ang-(1-6) zu Ang-(1-4) und Ang-(5-6)

Wie auch die Peptide Ang II, Ang-(1-7) und Ang-(2-7), könnte auch Ang-(1-6) durch Neprilysin in die Fragmente Ang-(1-4) und Ang-(5-6) gespalten werden. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass Ang-(1-6) in den ersten Stunden durch A deutlich schneller abgebaut wird. Gegen die Beteiligung einer Carboxypeptidase spricht das Fehlen des Spaltproduktes Ang-(1-5), das mittels HPLC nachzuweisen wäre. Die Beteiligung einer Aminopeptidase kann hingegen nicht ausgeschlossen werden.

Ang-(3-7) zu Ang-(4-7)

Auch beim Abbau von Ang-(3-7) entsteht wie bereits bei der Hydrolyse von Ang-(2-10) ein Peptid mit der Retentionszeit 8 min, bei dem es sich vermutlich um das Fragment Ang-(4-7) handelt. Ein Fragment von Ang-(3-7), das ausreichend lange auf der Säule verweilt, kann nur durch eine Exopeptidase entstehen. Ang-(3-7) ist durch die C-terminale Stellung von Prolin vor dem Abbau durch eine Carboxypeptidase geschützt (siehe Abschnitt Ang-(1-7) zu Ang-(1-4) und Ang-(5-7)). Wie bereits im Abschnitt Ang-(2-10) zu Ang-(2-7) ausgeführt, scheint es sich hierbei um ein Peptid mit einer freien 4er-AS zu handeln. Diese Tatsachen sprechen für die Aktivität einer Aminopeptidase, die die aminoterminalen AS Valin von Ang-(3-7) abspaltet.

Somit scheint das Peptid bei 8 min Retentionszeit mehreren kurzen Ang-Peptiden zu entsprechen: Ang-(6-8) (siehe Abschnitt Ang-(5-8) zu Ang-(6-8)) und den Fragmenten Ang-(2-7) (Abschnitt Ang-(2-10) zu Ang-(2-7)) und Ang-(4-7).

Neprilysin

Zusammenfassend kann über Neprilysin gesagt werden, dass es sich hierbei um ein Schlüsselenzym des lokalen Fettgewebe-RAS handelt. Es wird sowohl auf PA als auch insbesondere auf A exprimiert und hydrolysiert Ang-(1-10) und Ang-(1-9) zu Ang-(1-7). Möglicherweise ist es zudem für die Spaltung von Ang-(2-10) zu Ang-(2-7), Ang-(2-7) zu Ang-(2-4) und Ang-(5-7), Ang-(1-7) zu Ang-(1-4) und Ang-(5-7), Ang-(1-6) zu Ang-(1-4) und Ang-(5-6) sowie Ang-(2-8) zu Ang-(5-8) verantwortlich.

Ausblick

Nachdem die Abbaukinetik und die beteiligten Enzyme des lokalen RAS des Fettgewebes zu weiten Teilen dargestellt werden konnten, sollte im nächsten Schritt die biologische Funktion der zentralen Peptide Ang-(1-7) und Ang-(3-8) sowohl lokal im Fettgewebe, als auch systemisch untersucht werden. Desweiteren wären vergleichende Studien mit viszeralem Fettgewebe aufschlussreich zur Beantwortung der Frage nach Effektorpeptiden und biologischer Wirkung des RAS. Sollten sich die Abbauwege und entstehenden Peptide hier deutlich unterscheiden, wäre die Vermutung, vermehrtes Fettgewebe könnte zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen, nicht zu verallgemeinern. Aus meinen Ergebnissen wäre eher eine protektive Funktion des subkutanen Fettgewebes zu vermuten.

6 Zusammenfassung

Das humane systemische Renin-Angiotensin-System wirkt über seinen zentralen Metaboliten Angiotensin II an der Regulation des Blutdruckes und des Salz- und Wasserhaushaltes mit. Die Reaktionswege und beteiligten Peptide, sowie die Funktion des lokalen Renin-Angiotensin-Systems des humanen Fettgewebes sind jedoch bisher noch wenig bekannt. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden humane subkutane Präadipocyten in vitro zu Adipocyten differenziert und mit verschiedenen Angiotensin-Peptiden und Enzym-Inhibitoren versetzt. Die Zellüberstände wurden mittels optimierter HPLC-Methodik auf Synthese und Hydrolyse verschiedener Angiotensin-Spaltprodukte und mögliche beteiligte Enzyme untersucht. Besonderes Augenmerk wurde hier auf Angiotensin-Peptide mit bekannter biologischer Wirkung, sowie auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Renin-Angiotensin-System des Fettgewebes und dem häufig gemeinsamen Auftreten von Adipositas, Hypertonus und kardiovaskulären Erkrankungen gelegt. Des weiteren wurde die endogene Angiotensinogen-Produktion sowie der Abbau exogen zugegebenen Angiotensinogens mittels immunologischem Nachweis und Western Blot untersucht.

Als wesentlichsten Unterschied zum klassischen Renin-Angiotensin-System bildeten Präadipocyten und Adipocyten Angiotensin-(1-7) als zentrales Syntheseprodukt aus Angiotensin I. Für seine Entstehung und Hydrolyse ist das Enzym Neprilysin verantwortlich. Angiotensin-(1-7) wies bisher in verschiedenen Geweben eine zu Angiotensin II antagonistische, vasoprotektive, vasodilatatorische und blutdrucksenkende Funktion auf. Sollte das im Fettgewebe entstehende Angiotensin-(1-7) systemisch wirken, scheint dem subkutanen Fettgewebe somit eher eine protektive systemische Funktion bezüglich der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen zuzukommen. Als weiteres relativ stabiles Syntheseprodukt des Angiotensinogen-Abbaus im Fettgewebe entstand Angiotensin-(3-8), das als Inhibitor der Insulin-regulierten Aminopeptidase (IRAP) eine Rolle im Glucose-Haushalt spielen könnte. Das vasoaktive Angiotensin II des klassischen Renin-Angiotensin-Systems konnte im Fettgewebe nicht in nennenswerten Mengen nachgewiesen werden. Das zentrale Enzym des Fettgewebe-Renin-Angiotensin-Systems ist Neprilysin. Des weiteren konnte noch die Beteiligung mindestens einer Aminopeptidase und einer Carboxypeptidase nachgewiesen werden.

Der versuchte Nachweis von endogen durch Präadipocyten oder Adipocyten produziertem Angiotensinogen gelang nicht. Exogen zugegebenes Angiotensinogen nahm initial ab und im weiteren Verlauf wieder zu. Der Mechanismus hierfür bleibt unklar.

7 Literaturverzeichnis

Ackerly J. A., Felger T. S. & Peach M. J. (1976). Des-Asp¹-angiotensin I: a metabolite of angiotensin I in the perfused feline adrenal. *Eur. J. Pharmacol.* 38: 113-121

Aguilera G. & Catt K. J. (1979). Loci of aldosterone biosynthesis in isolated glomerulosa cells. *Endocrinology* 104: 1046-1052

Albiston A L., McDowall S. G., Matsacos D., Sim P., Clune E., Mustafa T., Lee J., Mendelsohn F. A., Simpson R. J., Connolly L. M. & Chai S. Y. (2001). Evidence that the angiotensin IV (AT₄) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 276: 48623-48626

Allred A. J., Diz D. I., Ferrario C. M. & Chappell M. C. (2000). Pathways for angiotensin-(1-7) metabolism in pulmonary and renal tissues. *Am. J. Physiol.* 279: F841-F850

Arolas J. L., Lorenzo J., Rovira A., Vendrell J., Aviles F. X. & Ventura S. (2004). Secondary binding site of the potato carboxypeptidase inhibitor. Contribution to its structure, folding, and biological properties. *Biochemistry* 43: 7973-7982

Bauvois B. & Dauzonne D. (2006). Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) Inhibitors: Chemistry, biological evaluations and therapeutical prospects. *Med. Res. Rev.* (26)1: 88-130

Biron P., Meyer P. & Panisset J. C. (1968). Removal of angiotensins from the systemic circulation. *Canad. J. Phys. Pharm.* 46: 175-178

Blanco-Aparicio C., Molina M. A., Fernández-Salas E., Frazier M. L., Mas J. M., Querol E., Avilés F. X. & de Llorens R. (1993). Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibits tumor cell growth. *Protein Engineering* 7(6): 675-682

Böttcher A., Böttcher A., Schmitz G., Schling P. (2006). Angiotensin-converting enzyme signalling in human preadipocytes and adipocytes. *Centr. Eur. J. Biol.* 1(2): 203-220

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem* 72: 248-254

Burdi A. R., Poissonnet C. M., Garn S. M., Lavelle M., Sabet M. D. & Bridges P. (1985). Adipose tissue growth patterns during human gestation: a histometric comparison of buccal and gluteal fat depots. *Int. J. Obes.* 9: 247-256

Burrell L. M., Johnston C. I., Tikellis C. & Cooper M. E. (2004). ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab* 15: 166-169

Campagnole-Santos M. J., Heringer S. B., Batista E. N., Khosla M. C. & Santos R. A. (1992). Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am. J. Physiol.* 263(1): R89-94

- Campbell D. J. & Habener J. F. (1987). Cellular localization of angiotensinogen gene expression in brown adipose tissue and mesentery: quantification of messenger ribonucleic acid abundance using hybridization in situ. *Endocrinology* 121: 1616-1626
- Cesari M., Rossi G. P. & Pessina A. C. (2002). Biological properties of the angiotensin peptides other than angiotensin II: implications for hypertension and cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* 20: 793-799
- Chappell M. C., Allred A. J. & Ferrario C. M. (2001). Pathways of angiotensin-(1-7) in the kidney. *Nephrol Dial Transplant* 16 [suppl]: 22-26
- Chappell M. C., Pirro N. T. & Sykes A. (1998). Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting-enzyme. *Hypertension* 31: 362-367
- Darimont C., Vassaux G., Ailhaud G. & Negrel R. (1994). Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology* 135: 2030-2036
- Deddish P. A., Marcic B., Jackman H. L., Wang H. Z., Skidgel R. A. & Erdös E. G. (1998). N-domain specific substrates and C-domain inhibitors of angiotensin converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension*. 31: 912-917
- De Mello W. C. (2004). Angiotensin-(1-7) re-establishes impulse conduction in cardiac muscle during ischaemia-reperfusion. The role of the sodium pump. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 5: 203-208
- Dzau V. J., Ellison K. E., Brody T., Ingelfinger J. & Pratt R. E. (1987). A comparative study of the distribution of renin and angiotensinogen messenger ribonucleid acids in rat and mouse tissue. *Endocrinology* 120: 2334-2338
- Engeli S., Böhnke J., Gorzelniak K., Janke J., Schling P., Bader M., Luft F. C. & Sharma A. M. (2005). Weight Loss and the Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *Hypertension* 45: 356-362
- Engeli S., Negrel R. & Sharma A. M. (2000) Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35: 1270-1277
- Engeli S., Schling P., Gorzelniak K., Boschmann M., Janke J., Ailhaud G., Teboul M., Massiéra F. & Sharma A. M. (2002). The Adipose-Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone System: Role in the Metabolic Syndrome? *J. Biochem. Cell Biol.* 35: 807-825
- Erdös E. G. (1975). Angiotensin I converting enzyme. *Circ. Res.* 36: 247-255
- Erdös E. G. (1990). Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. *Hypertension* 16: 363-370
- Erdös E. G. & Skidgel R. A. (1989). Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones. *FASEB J.* 3: 145-151

- Ferrario C. M., Trask A. J. & Jessup J. A. (2005). Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2281-2290
- Field L. J., McGowan R. A., Dickinson D. P. & Gross K. W. (1984). Tissue and gene specificity of mouse renin expression. *Hypertension* 6: 597-603
- Flier J. S. (1998). Clinical review 94: what's in a name? In search of leptin's physiological role. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 1407-1413
- Folli F., Kahn C. R., Hansen H., Bouchie J. L. & Feener E. P. (1997). Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. *J. Clin. Invest* 100(9): 2158-2169
- Foulon T., Cadel S. & Cohen P. (1999). Molecules in focus. Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 31: 747-750
- Freeman E. J., Chisolm G. M., Ferrario C. M. & Tallant E. A. (1996). Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 28(1): 104-108
- Glimcher P. W., Giovino A. A., Margolin D. H. & Hoebel B. G. (1984). Endogenous opiate reward induced by an enkephalinase inhibitor, thiorphan, injected into the ventral midbrain. *Behav Neurosci.* 98(2): 262-268
- Goodfriend T. L. (1993). Angiotensinases. In: Robertson J. I. S., Nicholls M. G., eds. *The Renin-Angiotensin System*. Vol 1. London, UK: Gower Medical Publishing: 11.1-11.5
- Gregoire F. M. (2001). Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp. Biol. Med.* Vol. 226(11): 997-1002
- Gregoire F. M., Smas C. M. & Sul H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78: 783-809.
- Harmer D., Gilbert M. Borman R. & Clark K. L. (2002). Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett* 532: 107-110
- Harte A. L., McTernan P. G., McTernan C. L., Crocker J., Starcynski J., Barnett A. H., Matyka K. & Kumar S. (2003). Insulin increases angiotensinogen expression in human abdominal subcutaneous adipocytes. *Diabetes Obes. Metab.* 5: 462-467
- Harte A. L., Mc Ternan P., Chetty R., Coppack S., Katz J., Smith S. & Kumar S. (2005). Insulin-mediated upregulation of the renin angiotensin system in human subcutaneous adipocytes is reduced by rosiglitazone. *Circulation* 111: 1954-1961
- Hass G. M., Ager S. P., Le Tourneau D., Derr-Makus J. E. & Makus D. J. (1981). Specificity of the carboxypeptidase inhibitor from potatoes. *Plant. Physiol.* 67: 754-758
- Hattori A., Matsumoto H., Mizutani S. & Tsujimoto M. (1999). Molecular cloning of adipocyte-derived leucine aminopeptidase highly related to placental leucine aminopeptidase/oxytocinase *J. Biochem.* 125: 931-938

- Herbst J. J., Ross S. A., Scott H. M., Bobin S. A., Morris N. J., Lienhard G. E. & Keller S. R. (1997). Insulin stimulates cell surface aminopeptidase activity toward vasopressin in adipocytes. *Am. J. Physiol.* 272: E600-E606
- Hilchey S. D. & Bell-Quilley C. P. (1995). Association between the natriuretic action of angiotensin-(1-7) and selective stimulation of renal prostaglandin I₂ release. *J. Hypertens.* 25: 1238-1244
- Ichinose Y., Genka K. & Koike T. (2003). Randomized double-blind placebo-controlled trial of bestatin in patients with resected stage I squamous-cell lung carcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.* 95: 605-610
- Igic R., Erdös E. G., Yeh H. S. J., Sorrells K. & Nakajima T. (1972). Angiotensin I converting enzyme of the lung. *Circ. Res.* 31(suppl): 51-61
- Jackman H. L., Massad M. G., Sekosan M., Tan F., Brovkovich V., Marcic B. M. & Erdös E. G. (2002). Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart. Role of cathepsin A. *Hypertension* 39: 976-981
- Janke J., Engeli S., Gorzelniak K., Luft F. C. & Sharma A. M. (2002). Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes* 51: 1699-1707
- Jones B. H., Standridge M. K., Taylor J. W. & Moustaid N. (1997). Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: Analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am. J. Physiol.* 273: R236-R242
- Karlsson C., Lindell K., Ottosson M., Sjöström L., Carlsson B. & Carlsson L. M. (1998). Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 3925-3929
- Keller S. R. (2003). The insulin-regulated aminopeptidase: a companion and regulator of GLUT4. *Front. Biosci.* 8: S410-S420
- Keller S. R., Davis A. C. & Clairmont K. B. (2002). Mice deficient in the insulin-regulated membrane aminopeptidase show substantial decreases in glucose transporters GLUT4 levels but maintain normal glucose homeostasis. *J. Biol. Chem.* 277: 17677-17686
- Keller S. R., Scott H. M., Mastick C. C., Aebersold R. & Lienhard G. E. (1995). Cloning and characterization of a novel insulin-regulated membrane aminopeptidase from Glut 4 vesicles. *J. Biol. Chem.* 270: 23612-23618
- Kersten S. (2001). Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Reports* 2: 282-286
- Knox F. G. & Granger J. P. (1987). Control of sodium excretion: the kidney produces under pressure. *News Physiol. Sci.* 2: 26-29
- Kobayashi H. & Takei Y. (1996). The Renin-Angiotensin System. Comparative Aspects. *Zoophysiology* 35: 1-5

- Kono T., Ikeda F., Oseko F., Imura H. & Endo J. (1980). Biological activity of des-Asp¹-angiotensin I in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50(1): 40-45
- Krassói I., Pataricza J. & Papp J. G. (2003). Thiorphan enhances bradykinin-induced vascular relaxation in hypoxic/hyperkalaemic porcine coronary artery. *J. Pharm. Pharmacol.* (55) 3: 339-345
- Laemmli U. K. & King J. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Le Lay S., Krief S., Farnier C., Lefrere I., Le Liepvre X., Bazin R., Ferre P. & Dugail I. (2001). Cholesterol, a cell size-dependent signal that regulates glucose metabolism and gene expression in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 276: 16904-16910
- Lim B. C. & Sim M. K. (1998). Actions of des-Asp angiotensin I on the aortic rings of the normo- and hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 20(1): 105-117
- Lindpaintner K., Jin M., Toth W. M. & Ganten D. (1989). Aspects of molecular biology and biochemistry of the cardiac renin-angiotensin system. *Brit. J. Clin. Pharm.* 27: 159-165
- Look A. T., Ashmun R. A., Shapiro L. H. & Peiper S. C. (1989). Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD 13 (gp 150) is identical to aminopeptidase N. *J. Clin. Invest.* (83)4: 1299-1307
- Lowell B. B. & Spiegelman B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404: 652-660
- Lyons P. J., Callaway M. B. & Fricker L. D. (2008). Characterization of carboxypeptidase A6, an extracellular matrix peptidase. *J. Biol. Chem.* 283 (11): 7054-7063
- MacDougald O. A. & Lane M. D. (1995). Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 345-373
- Mentlein R. & Roos T. (1996). Proteases involved in the metabolism of angiotensin II, bradykinin, calcitonin gene-related peptide (CGRP) and neuropeptide Y by vascular smooth muscle cells. *Peptides* (17)4: 709-720
- Mitsui T., Nomura S., Okada M., Ohno Y., Kobayashi H., Nakashima Y., Murata Y., Takeuchi M., Kuno N., Nagasaka T., Wang J. O., Cooper M. D. & Mizutani S. (2003). Hypertension and angiotensin II hypersensitivity in aminopeptidase A-deficient mice. *Mol. Med.* 9: 57-62
- Morrison R. F. & Farmer S. R. (2000). Hormonal signalling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J. Nutr.* 130: 3116S-3121S
- Müller W. E., Schuster D. K., Zahn R. K., Maidhof A., Leyhausen G. & Falke D. (1982). Properties and specificity of binding sites for the immunomodulator bestatin on the surface of mammalian cells. *Int J Immunopharmacol* 4: 393-400

- Nagata Y., Mizutani S., Nomura S., Kurauchi O., Kasugai M. & Tomoda Y. (1991). Purification and properties of human placental aminopeptidase B. *Enzyme* 45: 165-173
- Naik G. O. & Moe G. W. (2000). Simultaneous separation of angiotensin and endothelin peptide families by high-performance liquid chromatography: application to the specific radioimmunoassay measurement of angiotensin II or endothelin-1 from tissue. *J. Chromatog.* 870: 349-361
- Ntamb J. M. & Kim Y. C. (2000). Adipocyte differentiation and gene expression. *J. Nutr.* 130: 3122S-3126S.
- Pairault J. & Green H. (1979). A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerolphosphatase dehydrogenase as differentiation marker. *PNAS* 7776 (10): 5138-5142
- Phillips M. I., Speakman E. A. & Kimura B. (1993). Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul. Peptides* 43: 1-20
- Pipkin F. B. & Symonds E. M. (1977). Factors affecting angiotensin II concentrations in the human infant at birth. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52: 449-456
- Poumarat J. S., Houillier P., Rismondo C., Roques B., Lazar G., Paillard M. & Blanchard A. (2002). The luminal membrane of rat thick limb expresses AT1 receptor and aminopeptidase activities. *Kidney Int.* 62(2): 434-445
- Prat-Larquemin L., Oppert J.-M., Clément K, Hainault I., Basdevant A., Guy-Grand B. & Quignard-Boulangé A. (2004). Adipose angiotensinogen secretion, blood pressure, and AGT M235T polymorphism in obese patients. *Obes. Res.* 12(3):556-561
- Roques B. P., Lucas-Soroca E., Chaillet P., Costentin J. & Fournie-Zaluski M. C. (1983). Complete differentiation between enkephalinase and angiotensin-converting-enzyme inhibition by retro-thiorphan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (80)11: 3178-3182
- Roques R. P., Noble F., Dauge V., Fournie-Zaluski M. C. & Beaumont A. (1993). Neutral Endopeptidase 24.11: structur, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 45: 87-146
- Roks A. J, van Geel P. P, Pinto Y. M, Buikema H., Henning R. H., De Zeeuw D. & van Gilst W. H. (1999). Angiotensin-(1-7) is a modulator of the human renin-angiotensin system. *J. Hypertens.* 34: 296-301
- Ross S. A., Scott H. M., Morris N. J., Leung W. Y., Mao F., Lienhard G. E. & Keller S. R. (1996). Characterization of the insulin-regulated membrane aminopeptidase in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 271: 3328-3332
- Ryan J. W., Ryan U. S., Schultz D. R., Whitaker C., Chung H. & Dorer F. E. (1975). Subcellular localization of pulmonary angiotensin-converting enzyme (kininase II). *J. Biochem.* 146: 497-499

- Saiki I., Fujii H., Yoneda J., Abe F., Nakajima M. & Tsuruo T. (1993). Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *Int J Cancer* 54: 137-43
- Samani N. J., Morgan K., Brammer W. J. & Swales J. D. (1987). Detection of renin messenger RNA in rat tissues: Increased sensitivity using an RNase protection technique. *J. Hypertension* 5 (suppl II): 19-21
- Santos R. A., Campagnole-Santos M. J. & Andrade S. P. (2000). Angiotensin-(1-7): an update. *Regul. Pept.* 91: 45-62
- Santos R. A., Simoes e Silva A. C., Maric C., Silva D. M., Machado R. P., de Buhr. I., Heringer-Walther S., Pinheiro S. V., Lopes M. T., Bader M., Mendes E. P., Lemos V. S., Campagnole-Santos M. J., Schultheiss H. P., Speth R. & Walther T. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8258-8263
- Saye J. A., Cassis L. A., Sturgill T. W., Lynch K. R. & Peach M. J. (1989). Angiotensinogen gene expression in 3T3-L1 cells. *Am. J. Physiol.* 256: C448-C451
- Saye J. A., Lynch K. R. & Peach M. J. (1990). Changes in angiotensinogen messenger RNA in differentiating 3T3-F442A adipocytes. *Hypertension* 15: 867-871
- Schäfer T., Schling P. & Löffler G. (2001). Degradation of angiotensin II by human adipose tissue cells. *Int. J. Obes.* 25 (Suppl. 3) : S21
- Schling P. (2002). Expression of Angiotensin II Receptors Type 1 and Type 2 in Human Preadipose Cells during Differentiation. *Horm. Metab. Res.* 34: 709-715
- Schling P. & Löffler G. (2001). Effects of Angiotensin II on adipose conversion and expression of genes of the renin-angiotensin system in human preadipocytes. *Horm. Metab. Res.* 33:189-195
- Schling P., Mallow H., Trindl A. & Löffler G. (1999). Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int. J. Obes.*, 23: 336-341
- Schling P. & Schäfer T. (2002). Human adipose tissue cells keep tight control on the angiotensin II levels in their vicinity. *J. Biol. Chem.* 277 (50): 48066-48075
- Scornik O. A. & Botbol V. (2001). Bestatin as an Experimental Tool in Mammals. *Current drug metabolism* 2(1): 67-85
- Sealey J. E., White R. P., Laragh J. H. & Rubin A. L. (1977) Plasma prorenin and renin in anephric patients. *Circ. Res.* 41 (suppl II): 17-21
- Skeggs L. T., Marsh W. H., Kahn J. R. & Shumway N. P. (1954). Existence of two forms of hypertension. *J. Exp. Med.* 99: 275-282
- Skidgel R. A., Defendini R. & Erdös E. G. (1987). Angiotensin I converting enzyme and its role in neuropeptide metabolism. In: Turner A. J. ed. *Neuropeptides and their peptidases*. Chichester: Ellis-Horwood Ltd.: 165-182

Skidgel R. A. & Erdös E. G. (1993). Biochemistry of angiotensin I-converting enzyme. In: Robertson J. I. S., Nicholls M. G., eds. *The Renin-Angiotensin System*. Vol 1. London, UK: Gower Medical Publishing: 10.1-10.10

Skidgel R. A. & Erdös E. G. (1998). Cellular Carboxypeptidases. *Immunol. Rev.* 161: 129-141

Snyder R. A. & Wintroub B. U. (1986). Inhibition of angiotensin-converting enzyme by des-Leu¹⁰-angiotensin I: a potential mechanism of endogenous angiotensin-converting enzyme regulation. *Biochim Biophys Acta.* 871: 1-5

Steppan C. M., Bailey S. T., Bhat S., Brown E. J., Banerjee R. R., Wright C. M., Patel H. R., Ahima R. S. & Lazar M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-312

Tigerstedt R. & Bergman P. G. (1898). Niere und Kreislauf. *Skandinavisches Archiv für Physiologie* 8: 223-271

Tobe H., Kojima F., Aoyagi T. & Umezawa H. (1980). Purification by affinity chromatography using amastatin and properties of aminopeptidase A from pig kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 613: 459-468

Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 76: 4350-4354

Turner A. J., Tipnis S. R., Guy J. L., Rice G. & Hooper N. M. (2002), ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallocarboxypeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol.* 80(4): 346-353

Unger T., Badoer E., Ganten D., Lang R. E. & Rettig R. (1988). Brain angiotensin: Pathways and pharmacology. *Circulation* 77 (suppl I): 1-10

van Harmelen V., Ariapart P., Hoffstedt J., Lundkvist I., Bringman S. & Arner P. (2000) Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes. Res.* 8: 337-341

Vaughan E. D., Peach M. J., Ackerly J. A., Tsai B. S. & Larner A. (1977). Pressor and stereoidogenic actions of [des-Asp¹]angiotensin I dependency on conversion to angiotensin III. *Circ. Res.* 40 (5 Suppl1): I 94-97

Vickers C., Hales P., Kaushik V., Dick L., Gavin J., Tang J., Godbout K., Parsons T., Baronas E., Hsieh F., Acton S., Patane M., Nichols A. & Tummino P. (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol Chem* 277: 14838-14843

Wilkes S. H. & Prescott J. M. (1985). The slow tight binding of Bestatin and Amastatin to Aminopeptidases. *J. Biol. Chem.* 260 (24): 13154-13162

Wright J. W. & Harding J. W. (1994). Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioural responses. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 21-53

Wright J. W. & Harding J. W. (1997). Important role of angiotensin III in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res. Rev.* 25: 96-124

Wright J. W., Krebs L. T., Stobb J. W. & Harding J. W. (1995). The Angiotensin IV System: Functional Implications. *Front. Neuroendocrinol.* 16: 23-52

Wright J. W., Stublely L., Pederson E. S., Kramar E. A., Hanesworth J. M. & Harding J. W. (1999). Contributions of the Brain Angiotensin IV-AT₄ Receptor Subtype System to Spatial Learning. *J. Neurosci.* 19: 3952-3961

Yeager C. L., Ashmun R. A., Williams R. K., Cardellichio C. B., Shapiro L. H., Look A. T. & Holmes K. V. (1992). Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357(6377): 420-422

Yeh T.-Y. J., Sbodio J. I., Tsun Z.-Y., Luo B. & Chi N.-W. (2007). Insulin-stimulated exocytosis of GLUT4 is enhanced by IRAP and its partner tankyrase. *Biochem. J.* 402: 279-290

Zini S., Fournie-Zaluskie M. C., Chauvel E., Roques B. P., Corvol P. & Llorens-Cortes C. (1996). Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors; predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11968-11973

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Das Periodensystem der Elemente, der Aminosäurecode, sowie SI-Einheiten wurden als bekannt voraus gesetzt.

A	Adipocyten
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ADH	antidiuretisches Hormon
AGT	Angiotensinogen
AK	Antikörper
ANF	atrial natriuretic factor
Ang ...	Angiotensin...
APA	Aminopeptidase A
APB	Aminopeptidase B
APN	Aminopeptidase N
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensinrezeptor Typ 1
AT ₂ -Rezeptor	Angiotensinrezeptor Typ 2
AVP	Arginin Vasopressin
B ₂ -Rezeptor	Bradykininrezeptor Typ 2
bFGF	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BSA	Bovine Serum Albumine
CD	cluster of differentiation
CITR	Cortisol-IBMX-Triiodothyronin-Rosiglitazon
CTR	Cortisol-Triiodothyronin-Rosiglitazon
CP	Carboxypeptidase
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMEM	Dulbecco modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetic-Säure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor

FFS	freie Fettsäuren
FKS	Fetales Kälber Serum
GLUT ₄	Glucose Transporter Typ 4
GPDH	Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase
HDL	High density lipoprotein
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HWZ	Halbwertszeit
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IRAP	Insulin-regulierte Aminopeptidase
LAP	Leucin-Aminopeptidase
LDL	Low density lipoprotein
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NO	nitric oxid
PA	Präadipocyten
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor Typ-1
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	Potato Carboxypeptidase Inhibitor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAS	Renin-Angiotensin-System
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Dodecylsulfat Na-Salz
TEAF	Triethylammonium-formiat
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
ZNS	zentrales Nervensystem

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Reaktionsfolge des klassischen RAS	3
Abbildung 2: AS-Sequenz der biologisch aktiven humanen Angiotensin-Peptide.	5
Abbildung 3: Konfluente Präadipocyten und Adipocyten.....	32
Abbildung 4: Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerol-3-Phosphat durch GPDH, ein Schlüsselenzym der Triglycerid-Synthese.....	34
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Western-Blot-Vorrichtung	42
Abbildung 6: Schema des immunologischen Proteinnachweises.....	43
Abbildung 7: Muster des SD6-Mediums im HPLC-Lauf.....	45
Abbildung 8: gemeinsames Auftreten aller Ang-Peptide in einem HPLC-Lauf	47
Abbildung 9: Ausgleichsgeraden der einzelnen Ang-Peptide	49
Abbildung 10: Ang-(1-10) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A.....	52
Abbildung 11: Ang-(2-10) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A.....	55
Abbildung 12: Ang-(1-9) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A.....	56
Abbildung 13: Ang-(2-8) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A.....	58
Abbildung 14: Ang-(3-8) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A.....	60
Abbildung 15: Ang-(4-8) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A.....	61
Abbildung 16: Ang-(5-8) - Abbaukinetik, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A	62
Abbildung 17: Ang-(1-7) - Abbaukinetik, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A	64
Abbildung 18: Ang-(3-7) - Abbaukinetik, Spaltprodukte, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A.....	66
Abbildung 19: Ang-(1-6) - Abbaukinetik, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A	67
Abbildung 20: Ang-(1-5) - Abbaukinetik, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A	68

Abbildung 21: Ang-(1-10) – Abbaukinetik nach Zugabe von 100 μ M Thiorphan, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A....	71
Abbildung 22: Ang-(2-10) – Abbaukinetik nach Zugabe von 100 μ M PCI, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A.....	74
Abbildung 23: Ang-(1-9) – Abbaukinetik nach Zugabe von 100 μ M Thiorphan, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A....	77
Abbildung 24: Ang-(2-8) – Abbaukinetik nach Zugabe von 100 μ M Amastatin, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A ...	80
Abbildung 25: Ang-(3-8) – Abbaukinetik nach Zugabe von 100 μ M Amastatin, Proteingehalt und spezifische GPDH-Aktivität im Vergleich PA und A ...	82
Abbildung 26: Abbau von AGT durch PA (a) und A (b), SDS-Page und immunologische Detektion mit einem primären anti-human AGT-Antikörper (n=3).....	84
Abbildung 27: Verlauf der Konzentration extern zugegebenen AGT`s zu humanen PA und A (n=3)	84
Abbildung 28: AGT-Abbau durch PA und A (n=3).....	85
Abbildung 29: Proteinkonzentration und spezifische GPDH-Aktivität der in den Versuchen zur Abbaukinetik von AGT verwendeten PA und A (n=3).....	85
Abbildung 30: aus den Versuchen abgeleitetes Reaktionsschema des lokalen Fettgewebe- RAS mit den beteiligten Enzymen	90

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Spenderdaten der Präadipocyten und Adipocyten.....	32
Tabelle 2:	In den Abbaukinetiken verwendete PA- und A-Präparationen	36
Tabelle 3:	In den Inhibitorversuchen verwendete PA- und A-Präparationen.....	36
Tabelle 4:	Verwendete Inhibitoren	37
Tabelle 5:	Retentionszeiten, Primärsequenz und Anteil hydrophober AS der untersuchten Ang-Peptide.....	46
Tabelle 6:	Steigungsgeraden mit Standardabweichungen der einzelnen Ang-Peptide, sowie errechnete Konzentration in μM der 500 μM -Werte	50
Tabelle 7:	Vergleich der Halbwertszeiten der Hydrolyse verschiedener Ang-Peptide im Vergleich PA und A	68
Tabelle 8:	Änderung der Halbwertszeiten der untersuchten Ang-Peptide für PA und A nach Zugabe der Inhibitoren	82

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof Dr. Gerd Schmitz danken, dass er mir die Arbeit an dieser Dissertation ermöglicht hat und die erstklassige Technologie seines Instituts zur Verfügung stellte.

Ganz besonders möchte ich Frau Dr. Petra Schling für die exzellente Betreuung dieser Dissertation danken. Sie hat den Fortgang der Arbeit mit großem Interesse und Engagement verfolgt und stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Für seine Hilfsbereitschaft beim Erlernen verschiedener Labortechniken und für die Abholung und Aufbereitung der Gewebepreparate möchte ich Herrn Harry Isslinger danken.

Weiter möchte ich Frau Astrid Leikauf und Frau Ottilie Gass für die Betreuung des Zellkulturlabors und für ihre Unterstützung bei Fragen danken. Dank gilt auch Frau Jolanthe Aiwanger, die für die HPLC verantwortlich war und bei technischen Problemen immer gerne geholfen hat.

Für die Bereitstellung der Gewebepreparate möchte ich Frau Dr. med. Marita Eisenmann-Klein und ihrem Team der Abteilung für Plastische-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Caritas-Krankenhaus St. Josef, Regensburg, danken.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Philip G. McTernan, Queens Hospital, Birmingham, UK für die Bereitstellung des Anti-humanen-Angiotensinogen-AK.

Von ganzem Herzen möchte ich Herrn Dr. Timo Kosch danken, nicht nur für seine Hilfe bei den Abbildungen in dieser Arbeit, der Formatierung und diversen EDV-Problemen, sondern vielmehr für sein Verständnis und seine liebevolle persönliche Unterstützung.

Ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, Margitta und Maximilian Blaul, die mich mit viel Liebe und Geduld begleitet haben und mich ermuntert haben, auch in schwierigen Momenten nach vorne zu blicken.